Aus der Abteilung Innere Medizin II
Ärztlicher Direktor: Professor Dr. H. D. Waller
der Medizinischen Klinik der Universität Tübingen

Beschreibung von zwei cytoplasmatischen Antikörpern – Anti-M8 und Anti-MF2 – bei Patienten mit primär-biliärer Zirrhose

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der Medizinischen Fakultät
(Klinische Medizin)
der Eberhard-Karls-Universität
Tübingen

vorgelegt von
PAUL WEBER
aus Bad Waldsee

1986

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41543922_0082

Aus der Abteilung Innere Medizin II
Ärztlicher Direktor: Professor Dr. H. D. Waller
der Medizinischen Klinik der Universität Tübingen

Beschreibung von zwei cytoplasmatischen Antikörpern – Anti-M8 und Anti-MF2 – bei Patienten mit primär-biliärer Zirrhose

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der Medizinischen Fakultät
(Klinische Medizin)
der Eberhard-Karls-Universität
Tübingen

vorgelegt von
PAUL WEBER
aus Bad Waldsee

1986

Dekan: Professor Dr. J. Dichgans
1. Berichterstatter: Professor Dr. P. A. Berg
2. Berichterstatter: Privatdozent Dr. U. T. Hopt

Druck: Zeeb-Druck, Tübingen 7 (Hagelloch)

Die vorliegende Arbeit entstand unter der Leitung und ständigen Anregung von Herrn Professor Dr. P.A. Berg. Durch seinen unermüdlichen Beistand und wertvolle Diskussionen ist die Fertigstellung erst möglich geworden. Dafür möchte ich mich herzlich bedanken.

Dank schulde ich auch Herrn E. Stechemesser für die Einführung in die methodischen Probleme und allen anderen Mitarbeitern des Immunpathologischen Labors von Prof. Berg für die hilfsbereite Zusammenarbeit. Weiterhin möchte ich mich bei Frau Dürnay für die geduldige Anfertigung der Abbildungen und bei Frau Netuschil für das Schreiben des Manuskripts bedanken.

Die Untersuchungen wurden jedoch erst durch die von der Deutschen Forschungsgemeinschaft bereitgestellten Mittel ermöglicht.

Teile der vorliegenden Arbeit sind veröffentlicht in:

Berg, P.A., P. Weber, J. Oehring, J. Lindenborn-Fotinos, E. Stechemesser: Significance of different types of mitochondrial antibodies in primary biliary cirrhosis. In: H.Brunner and H. Thaler: Hepatology: A Festschrift for Hans Popper. New York, Raven Press (1985) 231-241

Weber, P., J. Brenner, E. Stechemesser, R. Klein, U. Weckenmann, G. Klöppel, M. Kirchhof, V. Fintelmann, P.A. Berg: Characterization and clinical relevance of a new complement fixing antibody - anti-M8 - in patients with primary biliary cirrhosis. Hepatology 6 (1986) 553-559

Inhaltsverzeichnis

		Seite
A.	EINLEITUNG	1
B.	METHODEN, MATERIAL, MARKERSEREN UND KRANKENGUT	5
	I. METHODEN	5
	1. Gewebefraktionierung und Reinigung der Antigene	5
	1.1. Zellaufschluß und Herstellung eines Überstands für die Gelchromatographie	5
	1.2. Gelchromatographie	6
	1.3. Ionenaustauschchromatographie	8
	1.4. Diskontinuierlicher Saccharose-gradient	8
	2. Enzymatische und physikalische Behandlung verschiedener Antigen-fraktionen	9
	2.1. Trypsinbehandlung	9
	2.2. Behandlung mit Phospholipase A_2	9
	2.3. Nucleasebehandlung	10
	2.4. Nagarsebehandlung	10
	2.5. Ultraschallbehandlung	10
	3. Molekulargewichtsbestimmung durch Gelchromatographie	11
	4. Elektrophorese	11
	5. Bestimmung der Marker-Enzyme Succinat-Cytochrom C Reductase und NADH-Cytochrom C Reductase	12
	6. Isolierung von Submitochondrialen Partikeln (SMP)	12
	7. Komplementbindungsreaktion	13
	8. Proteinbestimmung	13

Seite

II. MATERIAL 14

1. Organe 14

2. Reagenzien und Lösungen 14

2.1. Enzyme 14

2.2. Substrate 15

2.3. Weitere Reagenzien 15

III. MARKER-SEREN 16

IV. KRANKENGUT 19

C. ERGEBNISSE 21

I. PRÄPARATION DES M8-ANTIGENS UND DES MF2-ANTIGENS 21

1. Charakterisierung des M8-Antigens 28

2. Isolierung des M8-Antigens aus verschiedenen Organen 33

3. Assoziation des M8-Antigens mit der äußeren Mitochondrienmembran 34

4. Präparation und Charakterisierung des MF2-Antigens 37

II. KLINISCHE RELEVANZ DER VERSCHIEDENEN AMA-PROFILE 41

1. Klinische Beobachtungen von PBC-Fällen mit Anti-M8 41

2. Differenzierung der MF2-Seren von MF1-Seren 45

D. DISKUSSION 50

E. ZUSAMMENFASSUNG 54

F. LITERATURVERZEICHNIS 56

A. EINLEITUNG

Der erste Fall einer primär biliären Zirrhose (PBC) wurde bereits 1851 (Addison u. Gull) beschrieben, der Begriff erst knapp hundert Jahre später eingeführt (Dauphinee u. Sinclair, 1949). Da diese Krankheit bisher erst in Spätstadien diagnostiziert wurde, hat sich der Begriff biliäre Zirrhose durchgesetzt (Scheuer, 1967). Im Frühstadium findet sich histologisch jedoch eine portale Hepatitis und Zeichen einer beginnenden Gallengangsdestruktion, so daß 1965 von Rubin et al. die Krankheit als chronische, nicht eitrige Cholangitis bezeichnet wurde. Die entzündlichen Infiltrationen bestehen aus Makrophagen, T-Zellen und Plasmazellen neben Granulozyten und Eosinophilen (Popper u. Paronetto, 1980).

Die Diagnose der PBC stützt sich auf die laborchemischen Parameter mit Erhöhung der alkalischen Phosphatase, der Immunglobuline der M-Klasse und den Nachweis von Mitochondrienantikörpern (AMA). Seit Kenntnis dieser Befunde ist es möglich geworden, asymptomatische von symptomatischen Formen der Erkrankung zu unterscheiden. Die Krankheit kann viele Jahre in der asymptomatischen Phase verbleiben und kommt vermutlich wesentlich häufiger vor als ursprünglich angenommen (Long et al., 1977; Tornay, 1980). Oft ist der Pruritus ein Frühsymptom. Die klinischen Erscheinungen wie Ikterus, Staetorrhoe, Hautpigmentierung, Xanthome und Hepatosplenomegalie repräsentieren meist die späteren Krankheitsstadien (Sherlock u. Scheuer 1973; McSween u. Berg, 1976; James et al., 1981).

Da die PBC nicht selten mit anderen systemischen Krankheiten assoziiert ist, wurde sie auch unter den Kollagenkrankheiten eingeordnet. So konnte bei der PBC eine Assoziation mit rheumatoider Arthritis (Marx u. O'Connell, 1979), Sklerodermie und CREST-Syndrom (Calcinosis cutis, Raynaud Phänomen,

Sklerodactylie und Teleangiektasie) beobachtet werden (Reynolds et al., 1971). Der polyglanduläre Charakter kommt an der Beteiligung der Tränen- und Speicheldrüsen als Sjögren-Syndrom (Golding et al., 1970) und des Pankreas mit Hyposekretion (Epstein et al., 1982) ("dry gland disease") zum Ausdruck. Sehr häufig finden sich auch Antikörper gegen Thyreoglobulin und Mikrosomen als Manifestationen einer Thyreoiditis (Crowe et al., 1980).

In seltenen Fällen wurde eine familiäre Häufung gesehen (Kato et al., 1981). Interessant sind auch neuere Beobachtungen über das erneute Auftreten einer PBC nach Lebertransplantation (Neuberger et al., 1982).

Man nimmt an, daß auf dem Boden einer immunologischen Fehlregulation die Erkrankung entsteht. Bei etwa 90 % der PBC-Patienten konnten zirkulierende Immunkomplexe nachgewiesen werden, die vorwiegend aus IgM-Immunglobulinen bestehen (Wands et al., 1978). Für die Aktivierung des immunologischen Systems spricht, daß das klassische und alternative Komplementsystem miteinbezogen ist (Potter et al., 1980). Bei einem großen Teil der Patienten wurden Kryoglobuline entdeckt. Für das Konzept einer Autoimmunerkrankung der PBC sprechen die von verschiedenen Autoren (Thomas et al., 1976; McFarlane et al., 1979; Berg u. Baum 1980; James et al., 1981) gemachten Beobachtungen, daß ein großer Teil der Patienten mit PBC eine veränderte T-Helfer/T-Suppressor-Ratio haben und auch die Funktion der Suppressor-Zellen vermindert ist; das heißt, diese Patienten sind nicht mehr in der Lage, die eventuell durch ein exogenes Agens induzierten Prozesse zu unterdrücken.

Die Analogien der histologischen und klinischen Befunde der PBC mit den Symptomen einer chronischen "Graft-versus-host"-Reaktion können so gedeutet werden, daß ein extrinsic Faktor bei prädisponierten Individuen die Histokompatibilitätsantigene, die in hoher Konzentration auch auf Gallengangs-

epithelien exponiert sind, in ihrer Antigenstruktur so verändert, daß das Immunsystem sensibilisiert wird (Epstein et al., 1980, James et al. 1981, Sherlock, 1982).

Die Ätiologie der Erkrankung bleibt jedoch unklar. Die hohe Inzidenz von mitochondrialen Antikörpern (AMA) könnte die Hypothese stützen, daß über kreuzreagierende Antigensysteme - Lipopolysaccharide aus bakteriellen Membranen, die wiederum Ähnlichkeit mit der mitochondrialen Membran haben - eine immunologische Aktivierung induziert wird (Berg, 1982).

Die Bedeutung der erstmals von Walker und Mitarbeitern (1965) beschriebenen AMA in der Diagnostik der PBC wird an der Frequenz der Antikörper deutlich. In einer prospektiven Studie über den Verlauf von 236 PBC-Patienten wurden in 91 % der Fälle Mitochondrienantikörper nachgewiesen (Christensen et al., 1980). Bei einer anderen Untersuchung mit 218 Patienten wurde eine Inzidenz von mehr als 99 % gefunden. Daraus wurde gefolgert, daß eine AMA-negative PBC möglicherweise gar nicht existiert (Munoz et al., 1981).

Neben AMA wurden bei den 236 Patienten Antikörper gegen glatte Muskultaur (SMA) in 33 %, gegen Kerne (ANA) in 31 % der Fälle und bei 26 % Schilddrüsenantikörper bestimmt.

Antikörper gegen Lebermembranantigene (LSP) wurden in anderen Untersuchungen je nach Stadien bei bis zu 70 % (Tsantoulas et al., 1980), Aktin-Antikörper bei 40-70 % der PBC-Patienten gefunden (Hamlyn u. Berg, 1980).

Die bei der PBC beobachteten mitochondrialen Antikörper weisen eine hohe Spezifität auf und unterscheiden sich von den bisher beobachteten Antikörpertypen - anti-M1 bis anti-M6 - (Berg et al., 1969; Labro et al., 1978; Homberg et al., 1982). So konnte gezeigt werden, daß die für die PBC spezifischen M2-Antikörper mit einem Antigen der inneren Membran reagieren, das nach Chloroformbehandlung von dem ATPase-Komplex dissoziiert werden kann (Lindenborn-Fotinos et al., 1982).

Neben der klassischen Form der PBC ist eine als Mischform (MF) beschriebene cholestatische Lebererkrankung bekannt, die außer dem M2-Antikörper einen zweiten mitochondrialen Antikörper (anti-M4) aufweist (Berg et al., 1975, 1980).

Histologisch findet man bei diesen Patienten gleichzeitig starke duktuläre Proliferationen mit ausgeprägter entzündlicher Aktivität und Mottenfraßnekrosen wie bei der chronisch-aggressiven Hepatitis (Klöppel et al., 1977, 1982). Im Gegensatz zur klassischen PBC, bei der nur die IgM-Globuline erhöht sind, finden sich bei der MF sowohl IgM- als auch IgG-Erhöhungen. Der Verlauf ist progressiver und kürzer, kann schubförmig sein, scheint jedoch besser auf eine immunsuppressive Therapie anzusprechen als die klassische PBC (Geubel et al., 1976; Zimmermann et al., 1977).

Da die PBC offensichtlich mit einer polyklonalen B-Zell-Stimulation einhergeht, liegt es nahe zu postulieren, daß in Seren von Patienten mit einer PBC Autoantikörper vorkommen, die mit anderen Determinanten als dem M2-Antigen reagieren.

In der vorliegenden Arbeit wird die Isolierung eines mit der äußeren Mitochondrienmembran assoziierten Antigens (M8-Antigen) beschrieben und gezeigt, daß bei etwa der Hälfte der Patienten mit klassischer PBC, die alle den PBC-spezifischen M2-Antikörper haben, Antikörper gegen ein trypsinsensitives Antigen der äußeren Mitochondrienmembran vorkommen, das als M8 bezeichnet wird.

Neben diesem M8-Antikörper konnte in Seren von Patienten mit MF ein komplementbindender Antikörper gegen ein zytoplasmatisches Antigen beobachtet werden, dessen eindeutige Charakterisierung bisher nicht gelungen ist. Es scheint jedoch festzustehen, daß dieser als anti-MF2 bezeichnete Antikörper weder mit Mikrosomen, noch mit Mitochondrien reagiert.

B. METHODEN, MATERIAL, MARKERSEREN UND KRANKENGUT

I. METHODEN

1. Gewebefraktionierung und Reinigung der Antigene

1.1. Zellaufschluß und Herstellung eines Überstands für die Gelchromatographie

Die Präparation erfolgte weitgehend wie bei McFarlane et al. (1977) beschrieben. Die Organe der entbluteten Tiere wurden von grobem Bindegewebe befreit; von den Nieren wurden die Organkapsel, das Mark und das Nierenbecken entfernt. Nachdem das Gewebe in Würfel von etwa einem Zentimeter geschnitten war, wurde es sofort in eisgekühlte Saccharoselösung (0,25 M Saccharose, pH 8,0 mit 0,1 N NaOH eingestellt) überführt und unter gelegentlichem Schütteln und halbstündigem Pufferwechsel 5 Stunden lang gewaschen. Die Zerkleinerung wurde nach Verdünnung um die Hälfte (50 % Gewicht/Volumen) mit einem Mixer (Waring Blendor) und zwischengeschaltetem Trafo für 110 V auf niedriger Stufe für 30 Sekunden durchgeführt. Die Suspension wurde im 30 ml Glaspotter mit Teflon Pestill (Braun, Melsungen) bei 250 UpM mit zwei Hüben homogenisiert.

Da die Reproduzierbarkeit der Antigengewinnung, insbesondere die Präparation einer M8-Antigenfraktion, die nicht mit M2-Antigen kontaminiert war, von einem schonenden Zellaufschluß abhing, sollte einem Pottergefäß mit großer Toleranz (etwa 0,15 mm) der Vorzug gegeben werden.

Das Homogenat wurde bei 105 000 g eine Stunde lang in der Ultrazentrifuge (Beckman L2 50B) sedimentiert. Eine weiße Lipidschicht wurde abgesaugt, um den roten, klaren Überstand - SN 105 000 - vorsichtig bis knapp über das Sediment

abhebern zu können. Bis zur weiteren Aufarbeitung wurde der Überstand in 20 ml Portionen bei -20°C konserviert.

1.2. Gelchromatographie

Sephadex G 100 Säule

Das Säulenformat betrug 100 x 5 cm (K50/100 Pharmacia Uppsala) mit einem effektiven Gelbett von 1800 ml.

Nach Auftauen einer 20 ml Portion des SN 105 000 bei Raumtemperatur erfolgte zur Entfernung grober Präzipitate eine weitere Zentrifugation mit 30 000 g für 20 Minuten (Sorvall RC 5, Rotor SS 34, 19 500 UpM). Die Elution mit Tris/EDTA-Puffer (0,1 M Tris, 0,2 M NaCl, 1 mM EDTA, pH 8,0) wurde mit Hilfe eines UV-Absorptionsmeßgerätes (KKB Uvicord II), das die optische Dichte bei 254 nm mißt, überwacht. Zur Fraktionierung war ein Fraktionssammler (LKB Ultratrac) nachgeschaltet. Ein Mehrkanalschreiber zeichnete den Vorgang auf. Die zu sammelnden Fraktionen unter dem ersten Peak (G 100, I) wurden mit einer gerührten Ultrafiltrationszelle (Berghof, Tübingen), deren Membranen (BM 500, Berghof) für Moleküle bis zu einem Molekulargewicht von 50 000 durchlässig sind, bei einem Stickstoffdruck von 5 bar auf ein Volumen von ca. 15 ml eingeengt.

Sepharose 6 B Säule

Als Säule diente ein Format von 100 x 2,6 cm (K26/100 Pharmacia) mit einem Volumen von 480 ml.

Die konzentrierte Lösung des ersten Peaks aus dem Sephadex-Lauf wurde mit Tris/EDTA-Puffer über Sepharose 6 B Gel chromatographiert. Der zweite Peak (KP 2) diente als Ausgangsfraktion für weitere Präparationen (vgl. Abb. 1).

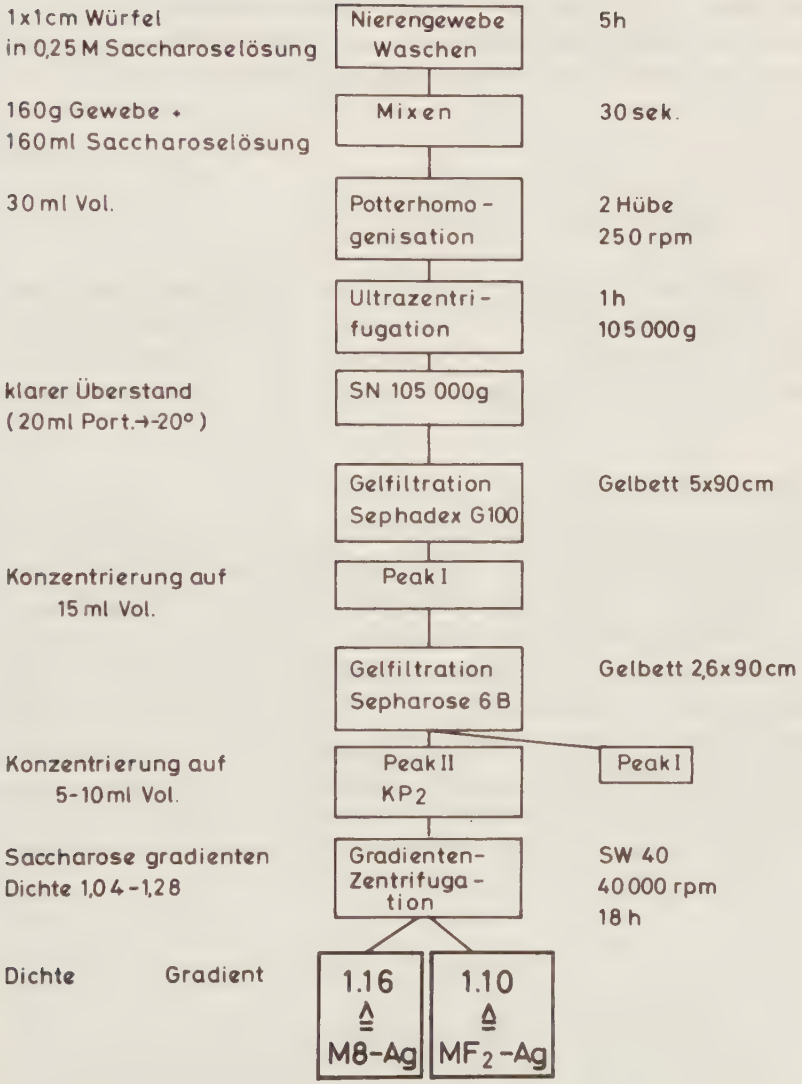


Abb. 1: Schematische Darstellung des Präparationsvorgangs für das M8-Antigen und MF2-Antigen aus Nierengewebe.

Die Ausbeute von Antigen war zwar aus Kaninchen- und Rattennieren am höchsten, doch wegen der unbegrenzten Verfügbarkeit von genügenden Gewebsmengen wurde das Antigen für größere Testreihen aus Schweinenieren gewonnen.

1.3. Ionenaustauschchromatographie

Zur Entfernung des Tris/EDTA-Puffers wurde die Probe über ein Sephadex G 25 Gel (Säulenformat 30 x 2,5 cm) mit Saccharose/EDTA-Puffer (0,25 M Saccharose, 1 mM EDTA, pH 7,8) eluiert und auf diese Weise von ionischem Puffer befreit.

AH-Sepharose 4 B

Die Vorbereitung des Austauschergels erfolgte nach den Empfehlungen der Firma (Affinity Chromatography, Principles and Methods, Pharmacia, 1977, Uppsala). Das Probenvolumen von 2 ml inkubierte eine Stunde an der Gelmatrix. Unter Kontrolle mit einem Leitfähigkeitsmeßgerät (WTW LF 39 T, Weilheim) wurden nacheinander mit Saccharose/EDTA-Puffer, 0,5 M Kaliumchlorid-Lösung und 1 M Kaliumchlorid-Lösung die Fraktionen eluiert. Die unter den jeweiligen Peaks gesammelten und fraktionierten Fraktionen dialysierten in Zelluloseschläuchen (Size 0-8 X 100 FT, Union Carbidge Corporation, Chicago).

1.4. Diskontinuierlicher Saccharosegradient

Von dem 2. Peak des Sepharose-6B-Laufs (KP2) wurden 3 ml auf einen Stufengradienten gelegt, der aus Saccharoselösung von je 1,2 ml mit folgenden Dichten bestand: 1,04 (10 %), 1,08 (20 %), 1,10 (24 %), 1,12 (29 %), 1,14 (34 %), 1,16 (37 %), 1,19 (43 %), 1,24 (52 %), 1,28 (59 %). Im Aus-

schwingrotor SW 40 (Beckman) zentrifugierten die Gradienten bei 40.000 Upm, entsprechend 200.000 g, während 18 Stunden bei 4°C (Beckman L5-65). Die einzelnen Gradientenfraktionen wurden mit einer Pasteurpipette von oben abgesaugt und in einer Verdünnung von 1:4 mit den Marker-Seren in der KBR getestet.

2. Enzymatische und physikalische Behandlung verschiedener Antigenfraktionen

2.1. Trypsinbehandlung

Die KP2-Fraktion in Saccharose/Tris/$CaCl_2$-Puffer (0,25 M Saccharose, 50 mM Tris, 12 mM $CaCl_2$, pH 7,8) wurde bei einem Proteingehalt von 2,5 mg/ml mit 50 µg Trypsin/mg Protein (aus Rinderpankreas, Böhringer) im geschüttelten Wasserbad bei 27°C für 30 min inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe der doppelten Menge Trypsin-Inhibitor (aus Hühnereiweiß, Böhringer) gestoppt.

Zur Trennung der Antigene vom Enzym wurden die Ansätze über den diskontinuierlichen Saccharosegradienten 18 Stunden zentrifugiert.

2.2. Behandlung mit Phospholipase A_2

Die gegen Tris/$CaCl_2$-Puffer dialysierten Antigene wurden bei 37°C für eine Stunde im Wasserbad mit Phospholipase A_2 versetzt. Für die KP_2-Fraktion betrug die Enzymmenge 0,5 mg/mg Protein. Wie oben, wurde die Reaktion im Eisbad gestoppt und die Antigene über Saccharosegradienten vom Enzym entfernt.

2.3. Nucleasebehandlung

Das gegen Borat/$CaCl_2$-Puffer (0,1 M Borat, 5 mM $CaCl_2$, mit 2 N NaOH auf pH 8,8 eingestellt) dialysierte KP_2-Protein (2,5 mg/ml) wird in einem Reaktionsansatz von 2 ml Protein, 2 ml 10 mM NaCl, 2 ml H_2O mit 0,1 N NaOH auf pH 9,2 eingestellt und nach Zugabe von 40 µl Nucleaselösung (aus Staph. aur. 15000 U, Boehringer) 30 min bei 37°C im Wasserbad inkuviert. Durch Zusatz von 1 ml 10 mM EDTA-Lösung wird die Reaktion beendet.

2.4. Nagarsebehandlung

Die KP_2-Fraktion und die submitochondrialen Partikel (SMP) wurden in Tris/$CaCl_2$-Puffer (0,1 M Tris, 0,2 M NaCl, 10 mM $CaCl_2$, pH 8,0) mit 100 µg bzw. die SMP mit 25 µg/mg Protein Nagarse (Bac. subt., Serva) für 45 min bei 37°C inkubiert und die Reaktion anschließend im Eisbad gestoppt. Die KP_2-Fraktion wurde über die Saccharosegradienten, die SMP durch Sedimentation bei 100.000 g für eine Stunde, vom Enzym befreit.

Über eine Sephadex G 50 Säule mit einem Gelbett von 60 x 1,5 cm wurde das enzymbehandelte Antigen mit Saccharose/Tris-Puffer (0,25 M Saccharose, 10 mM Tris, pH 7,9) fraktioniert.

2.5. Ultraschallbehandlung

Die Beschallung erfolgte mit Hilfe eines Branson Sonifier (Modell B 12) in vier Perioden zu 30 Sekunden im Eisbad auf Stufe 6.

3. Molekulargewichtsbestimmung durch Gelchromatographie

Zur orientierenden Molekulargewichtsschätzung wurden Eichkits (Pharmacia) von globulären Proteinen verwendet, die über dieselbe Sepharose 6 B Säule wie die KP-Fraktionen (Nierenhomogenat) eluiert wurden. Als vergleichender Elutionsvolumen-Parameter wurde der K_{av} gewählt, der sich aus der Gleichung $K_{av} = \frac{Ve - Vo}{Vt - Vo}$ errechnet, wobei V_e = Elutionsvolumen, V_o = Ausschlußvolumen der Säule und V_t = totales Bettvolumen bedeutet. Für jede Markersubstanz, hier: Aldolase (MG 158.000), Katalase (MG 232.000), Ferritin (MG 440.000) und Thyreoglobulin (MG 669.000) wurde der K_{av}-Wert gegen den Logarithmus der bekannten Molekulargewichte aufgetragen und das unbekannte Molekulargewicht der KP-Fraktionen über deren K_{av}-Werte abgelesen.

4. Elektrophorese

Die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) wurde nach der Methode von Lämmli (1970) mit einem Sammelgel von 4,5 % und einem Trenngel von 10 %, das durch 0,27 % Bisacrylamid vernetzt war, durchgeführt. Die Gele wurden bei einer Stärke von 2,7 mm mit 70 Volt, 40 mA für etwa 16 Stunden (Apparatur: Pharmacia, GE-2/4; Netzgerät: Desaga) in einem Tris/Glycin/SDS-Puffer, pH 8,3, "gefahren". Die Proben wurden in einem Tris/Glycin/SDS/Bromphenolblau-Puffer 5 Minuten bei 100°C denaturiert. Als Referenzproteine für die Molekulargewichtsbestimmung der Banden wurden sechs Marker verwendet: Phosphorylase b 94000, Albumin 67000, Ovalbumin 43000, Karboanhydrase 30000, Trypsininhibitor 20100 und a-Lactalbumin 14400 Molekulargewicht (calibration kit, Pharmacia).

5. Bestimmung der Marker-Enzyme Succinat-Cytochrom C Reductase und NADH-Cytochrom C Reductase

Die Reduktion von Cytochrom C durch die Enzyme wurde wie bei Sottocasa et al. (1967) durchgeführt.

Der Reaktionsansatz zur Testung auf Succinat-Cytochrom C Reductase bestand aus 3 ml Phosphatpuffer (50 mM, pH 7,5), der 3,0 mM Succinat (Bernsteinsäure-Na_2 x $6H_2O$, Serva), 0,1 mM Cytochrom C (aus Pferdeherz, Böhringer) und 0,3 mM KCN (Merck) enthielt. Im Testansatz für NADH-Cytochrom C Reductase waren in 3 ml Phosphatpuffer 0,1 mM NADH (NADH·Na_2, Grad II, Böhringer), 0,1 mM Cytochrom C, 0,3 mM KCN und 1,5 µM Rotenon (Serva) gelöst. Im jeweiligen Ansatz waren verschiedene Mengen von dem auf das Enzym zu untersuchende Antigen einpipettiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe des Substrats gestartet. Bei einer Temperatur von 25°C wurde die Reduktion von Cytochrom C bei einer Wellenlänge von 550 nm photometrisch gemessen.

Durch Ermittlung des Extinktionsunterschieds (ΔE) ließ sich die Enzymaktivität (A) nach der Formel

$$A = \frac{V \times 1000}{\varepsilon \times d \times v} \times \frac{\Delta E}{\Delta t}$$

berechnen, wobei für V = 3 ml, v = 0,03 ml, t = 1 min, d = 1 cm und ε von Cytochrom C bei 550 nm = 27,7 $cm^2 \times \mu M^{-1}$ steht. Die Aktivitäten wurden als spezifische Aktivität auf 1 mg Protein bezogen.

6. Isolierung von Submitochondrialen Partikeln (SMP)

SMP wurden von Mitochondrien aus Rinderherz nach der Methode von Sayers et al. (1979) isoliert. Nach Beschallung der Mitochondrien in vier Intervallen von je 30 sec wurden sie

zur Entfernung großer Fragmente 10 min bei 13.000 g zentrifugiert und der Überstand zur Sedimentation der SMP erneut bei 100.000 g 30 min lang zentrifugiert. Sie wurden zweimal mit TSE-Puffer (10 mM Tris, 0,25 M Saccharose, 1 mM EDTA, pH 7,4) gewaschen und in einer Proteinkonzentration von 15 mg/ml bei -18°C konserviert.

7. Komplementbindungsreaktion

Die Antigene wurden mit Hilfe hochtitriger Standardseren in der qualitativen Komplementbindungsreaktion (KBR) nach Roitt und Doniach (1969) getestet. Das 1:4 verdünnte Antigen und das von 1:32 bis 1:4000 austitrierte Serum wurde mit 2 MHD Komplement (guinea pig, Wellcome) versetzt, das der doppelten Menge der für die Hämolyse benötigten Komplementkonzentration entspricht, und mit einer 3 % Erythrozytenauspension inkubiert.

8. Proteinbestimmung

Nach Überprüfung der Reproduzierbarkeit von Messungen der Proteinkonzentration wurden die Bestimmungen nach Lowry et al. (1951) von der einfacher durchzuführenden Methode nach Bradford (1976) abgelöst.

Der Reagenzansatz bestand aus 100 mg Coomassie Brilliant Blue - G 250 (Merck) in 50 ml 95 % Äthanol gelöst, zu dem 100 ml 85 % Phosphorsäure gegeben wurden. Mit Aqua bidest. wurde auf ein Volumen von 1 Liter aufgefüllt. Eine Meßprobe bestand aus 0,1 ml Proteinlösung und 2 ml Farbreagenz, die mit dem Photometer (Beckman DB GT) bei 595 nm in Plexiglas-Küvetten gemessen wurden. Eichkurven wurden mit Verdünnungsreihen aus Rinderserumalbumin (Behring, Marburg) angefertigt.

II. MATERIAL

1. Organe

Menschliche Nieren stammten von Patienten, die wegen eines Hypernephroms nephrektomiert wurden. Die makroskopisch gesunden Organanteile gelangten zur Antigenpräparation.

Schweinenieren und -pankreas sowie Rinderherz wurde aus frisch geschlachteten Tieren im Schlachthof entnommen und sofort in eiskalte 0,25 M Saccharoselösung überführt.

Kaninchen (Albino) und Ratten (männliche Wistar-Ratten, etwa 350 g schwer) hatten vor Entnahme von Nieren und Leber einen Tag gehungert.

2. Reagenzien und Lösungen

2.1. Enzyme

Trypsin (aus Rinderpankreas) von Böhringer, Mannheim
Trypsin-Inhibitor (aus Hühnereiweiß) von Böhringer, Mannheim
Phosphilipase A_2 (aus Schweinepankreas), spezifische Akti-
Aktivität 800 U/mg von Böhringer, Mannheim.
Nuclease (aus Staph. aur.) 15000 U mg/ml von Böhringer,
Mannheim
Nagarse (aus Bac. subt.) BPN' 3.0 dimethyl casein units
(DMC) / mg mat. von Serva, Heidelberg

2.2. Substrate

$NADH \cdot Na_2$ (Grad II) von Boehringer, Mannheim.
Cytochrom C (aus Pferdeherz) von Boehringer, Mannheim.
Succinat-$Na_2 \cdot 6H_2O$, reinst, von Serva, Heidelberg.

2.3. Weitere Reagenzien

Rotenon (Serva)
KBR-Puffer: 1 Ca/Mg KBR-Tablette (Oxoid Ltd., London) pro 100 ml 0,01 %iger Albuminlösung (Serumalbumin vom Rind, Behringwerke Marburg)
Komplement: preserved guinea pig serum (Wellcome Reagents, Beckenham, England)
Erythrozyten: Hammelblut konserviert (Behringwerke, Marburg)
Amboceptor: Anti-sheep-hemolysin 1:4000 (Behringwerke, Marburg)
Rinderserumalbumin: BSA (Behringwerke, Marburg)

III. MARKER-SEREN

Die mitochondrialen und cytoplasmatischen Subfraktionen wurden mit einer Reihe von klassischen PBC-Seren und MF-Seren auf ihre unterschiedliche Antigenspezifität getestet.

Für die Charakterisierung des neu entdeckten M8-Antigens wurden zwei verschiedene hochtitrige Seren verwendet. Ebenso wurde der Nachweis des MF2-Antigens mit einem hochtitrigen MF-Serum erbracht.

Außer diesen Seren wurden folgende Antikörperkontrollen verwendet:

Anti-M1

Ein Antikörper gegen Cardiolipin, ein Lipoprotein, das in die innere Mitochondrienmembran lokalisiert wird und im Frühstadium der Syphilis gefunden wird (Wright et al., 1970).

Anti-M2

Der für die PBC spezifische Antikörper, der das mit der ATPase assoziierte Antigen in der inneren Mitochondrienmembran erkennt (Lindenborn et al., 1982).

Anti-M3

Dieser Antikörper wurde bei Patienten mit einem durch das Medikament Venopyronum® induziertem Pseudolupus-Syndrom gefunden. Das in der äußeren Mitochondrienmembran stark gebundene Antigen ist durch Salze nicht extrahierbar und gegenüber proteolytischen Enzymen insensitiv (Sayers et al., 1979).

Anti-M4

AMA-positive cholestatische chronisch aktive Lebererkrankungen (Mischform) sind neben anti-M2 mit einem zweiten Antikörper assoziiert, der gegen ein trypsininsensitives Anti-

Tabelle I: Markerseren, die zur Testung der Antigenaktivitäten verwendet wurden

Antikörpertyp	Serum	Antigen	Diagnose
Anti-M1	K.K.	Cardiolipin	Syphilis II
Anti-M2	M.D.	ATPase assoziiertes Antigen der inneren Mitochondrienmembran	Primär biliäre Zirrhose
Anti-M3	A.R.	Antigen der äußeren Mitochondrienmembran	Pseudolupus-Syndrom
Anti-M4	J.V.	Antigen der äußeren Mitochondrienmembran	Cholestatische CAH (Mischform, Typ 1)
Anti-M5	Pr.	Antigen der inneren Mitochondrienmembran	ANA-negative Kollagenosen
Anti-M6	Br.	Antigen der äußeren Mitochondrienmembran	Iproniazid induzierte Hepatitis
Anti-M7	nicht komplementbindend nicht getestet	Antigen der inneren Mitochondrienmembran	Kardiomyopathien/Myokarditiden

gen gerichtet ist, das wahrscheinlich in die äußere Mitochondrienmembran zu lokalisieren ist (Berg et al., 1980).

Anti-M5

Der Antikörper wurde bei wenigen Patienten mit einem systemischen Lupus erythematodes oder einer autoimmunen hämolytischen Anämie gefunden (Labro et al., 1978).

Anti-M6

Dieser seltene mitochondriale Antikörper konnte bei Patienten mit einer durch Iproniazid induzierten Hepatitis nachgewiesen werden (Homberg et al., 1982).

Anti-M7

Da der Antikörper nicht komplementbindend ist, wird er in der vorliegenden Untersuchung nicht weiter erwähnt (Klein et al., 1984).

Anti-LKM

Eine seltene Form der juvenilen chronischen Hepatitis, bei der Autoantikörper gegen Mikrosomen von Leber- und Nierentubuluszellen (Liver-Kidney-Microsomes) auftreten (Rizzetto et al., 1973).

Anti-LP

Der Antikörper reagiert mit einem aus Leber und Pankreas isolierbarem zytoplasmatischen Antigen (Berg et al., 1981). Klinisch handelt es sich um eine Sonderform der lupoiden Hepatitis.

Die zu testenden Serumkollektive aus den Jahren 1968 bis 1982 waren bei -20°C konserviert, nachdem sie zuvor 10 min bei 2000 UpM zentrifugiert wurden waren.

IV. KRANKENGUT

Der größte Teil der Seren stammte von Patienten aus dem DRK-Krankenhaus Hamburg (Prof. Lindner †), die übrigen aus verschiedenen Kliniken und Krankenhäusern der Bundesrepublik Deutschland und der Medizinischen Klinik Tübingen.

Die Untersuchungen stützen sich auf Seren von 103 Patienten, die alle biopsiert wurden. Bei 66 Fällen wurde die Diagnose einer klassischen PBC gestellt. Bei 33 Patienten bestanden gleichzeitig Hinweise auf eine CAH oder postnekrotische Leberzirrhose. In vier Fällen sprach die Histologie nicht eindeutig für eine PBC oder chronische Hepatitis.

Außer den histologischen Kriterien wurden die Seren auch nach biochemischen und klinischen Parametern in die Gruppe der klassischen PBC und der Mischform unterteilt (Tabelle II).

Tabelle II: Kriterien zur Unterscheidung von PBC von MF-Fällen

Leitbefunde	PBC	MF
granulomatöse Hepatitis	immer vorkommend	kann im Stadium I fehlen
entzündliche Aktivität (piecemeal Nekrosen)	diskret	deutlich
Bilirubin		
im Frühstadium	normal oder leicht erhöht	manchmal deutlich erhöht, Schwankungen
im Spätstadium	stark ansteigend	mäßig erhöht (2-3 mg/dl)
Immunglobuline	erhöht, isoliert IgM	stark erhöht, IgM und IgG
Markerantigene	M2	M2 und MF-Antigene

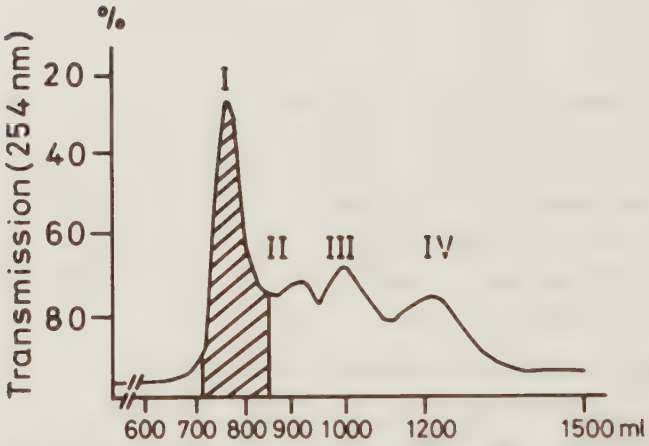
C. ERGEBNISSE

I. PRÄPARATION DES M8-ANTIGENS UND DES MF2-ANTIGENS

Die Antigenpräparationen wurden mit den Markerseren auf deren mitochondriale Antigene M1 bis M6 und auf die nicht-mitochondrialen Antigene LKM - ein mikrosomales Antigen (liver-kidney-microsomes) - und LP - ein leber- und pankreasspezifisches Antigen - getestet.

Wurde Protein des im Ausschlußvolumen eluierten ersten Peaks aus Nierenüberstand mit den Markerseren getestet, so fanden sich Aktivitäten sowohl mit allen PBC-Seren (anti-M2), als auch mit MF-Seren (anti-M2 und anti-M4 positiv) und mit PLE-Seren (anti-M3) (Abb. 2). Durch eine weitere Gelchromatographie über Sepharose 6B konnten in dieser Fraktion neue Antikörperspezifitäten entdeckt werden (Abb. 3). Ein Teil der PBC-Seren reagierte mit der Fraktion des KP2-Peaks und konnte so von den übrigen PBC-Seren differenziert werden, die nur mit der Ausgangsfraktion (Peak I, Sephadex G100) und mit dem ersten Peak des Sepharose 6B-Laufs reagierten. Damit konnte gezeigt werden, daß PBC-Seren einen zweiten Antikörper fakultativ aufweisen, im folgenden M8-Antikörper genannt. Mit der KP2-Fraktion wurden aber auch neue Antikörperspezifitäten in MF-Seren nachgewiesen. Ein kleinerer Teil der Seren mit histologisch und biochemisch definierter Mischform reagierte mit dieser Fraktion (MF2-Antigen).

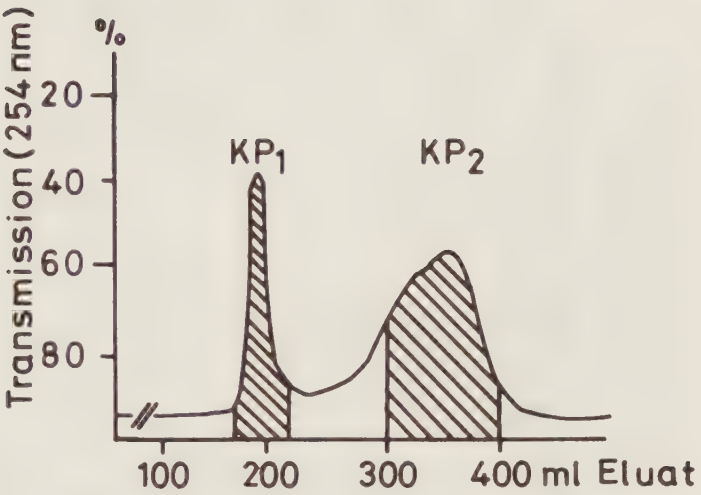
Mit Hilfe der Dichtegradientenzentrifugation konnte das M8-Antigen von dem MF2-Antigen getrennt werden (Abb. 4a). Nach 18-stündiger Zentrifugation wurde das M8-Antigen vorwiegend bei der Dichte 1.16 gefunden, während das MF2-Antigen bei Dichte 1.10 anreicherte. Wurde die Zentrifugation auf einen Zeitraum von 60 Stunden ausgedehnt, reicherte sich das M8-Antigen in den Dichten von 1.19 bis 1.24 an (Abb. 4b).



Marker Serum	I	II	III*	IV	Peak
PBC I (M2)	1000	ø	ø	ø	rez.Titer
PLE (M3)	1000	ø	ø	ø	
MF1 (M4)	2000	128	ø	ø	
PBC II (M8)	1000	64	ø	ø	
MF2	1000	128	ø	ø	

*Hämoglobin enthaltend

Abb. 2: Gelchromatographie des Nierenüberstands SN 105 000 g über Sephadex G 100. Nachweis von M2-, M3-, M8 und MF2-Antigen in Peak I durch die KBR. In Peak II sind nur geringe Antigenaktivitäten von M8 und MF2 enthalten. Peak III (hämoglobinhaltig) und Peak IV enthalten keine der mit den serologischen Markern getesteten Antigene.



Marker Serum	KP_1	KP_2	Fraktion
PBC I (M2)	512	∅	
PLE (M3)	1000	∅	
MF1 (M4)	2000	2000	
PBC II (M8)	1000	1000	
MF2	1000	1000	

Abb. 3: Gelchromatographie von Peak I des G 100-Laufs (Abb. 2) über Sepharose 6B. Dissoziation von M8- und MF2-, von M2- und M3-Antigen (Peak II).

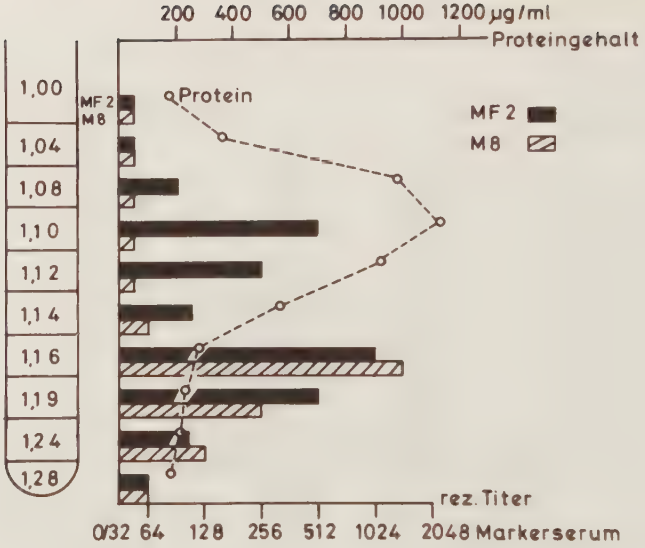

200 400 600 800 1000 1200 µg/ml
Proteingehalt
1,00
1,04
1,08
1,10
1,12
1,14
1,16
1,19
1,24
1,28
MF2
M8
Protein
MF2
M8
rez. Titer
0/32 64 128 256 512 1024 2048 Markerserum

Abb. 4a

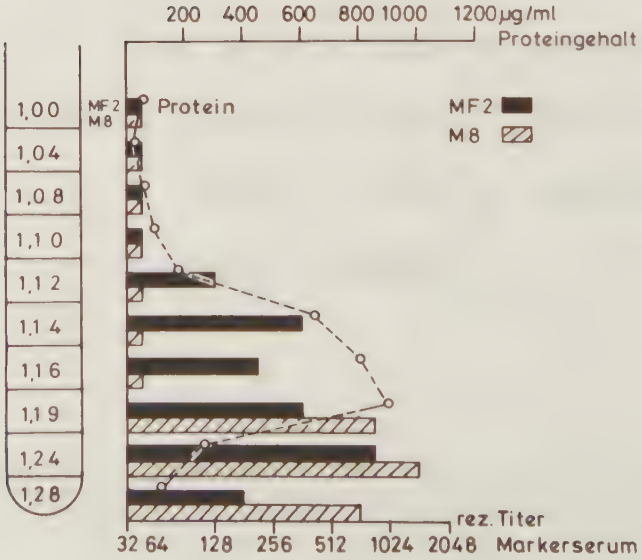

200 400 600 800 1000 1200 µg/ml
Proteingehalt
1,00
1,04
1,08
1,10
1,12
1,14
1,16
1,19
1,24
1,28
MF2
M8
Protein
MF2
M8
rez. Titer
32 64 128 256 512 1024 2048 Markerserum

Abb. 4b

Da mit dem M8-Antigen der Gradientenfraktion (1.16) auch die MF-Seren reagierten, sollte geklärt werden, ob das M8-Antigen eine Kontamination von MF-Antigen enthält oder ob eine Assoziation verschiedener Antikörper vorliegt. MF-Seren waren bisher serologisch dadurch definiert, daß sie, im Gegensatz zu PBC-Seren, mit submitochondrialen Partikeln (SMP) auch noch nach deren Inkubation mit Nagarse oder Trypsin ein proteasenstabiles Antigen - das M4-Antigen - zu erkennen vermochten (Abb. 5a). Im Gegensatz dazu konnte bei Testung von anti-M8 positiven Seren keine Reaktion mit den trypsininsensitiven Antigenen (SMP) beobachtet werden. Um festzustellen, inwieweit die M8-Fraktion mit MF2-Antigen kontaminiert war, wurde die Fraktion mit Proteasen behandelt und mit Anti-M8-Serum getestet (Abb. 5b). Wie in Abb. 5c gezeigt, ist das MF2-Antigen proteasenresistent. Wäre im Gradienten 1.16 auch MF2-Aktivität enthalten, müßte die Reaktion mit MF2-Serum erhalten bleiben. Da jedoch die Reaktion mit Anti-M8-Seren und Anti-MF2-Seren nach Enzymbehandlung der Fraktion erlischt, kann gezeigt werden, daß das M8-Antigen trypsinsensitiv ist und das MF2-Antigen trypsininsensitiv und die M8-Fraktion frei von MF2-Antigen ist. Weiter kann gefolgert werden, daß sowohl anti-M4 positive Seren und MF2-Seren parallel den M8-Antikörper enthalten.

Abb. 4a: Saccharosegradientenzentrifugation der KP2-Fraktion zur Trennung des M8- von dem MF2-Antigen. Anreicherung des MF2-Antigen nach 18 Stunden (200 000 g) im Saccharosegradienten der Dichte 1.10 und des M8-Antigens im Gradienten der Dichte 1.16. Das Maximum von Proteinen findet sich im Bereich der Dichte 1.10.

Abb. 4b: Isopyknische Zentrifugation der KP2-Fraktion. Nach 60 Stunden Zentrifugation Anreicherung der MF2-Antigens bei Dichte 1.14 und des M8-Antigens bei 1.19 bos 1.28.

ANTIGENE

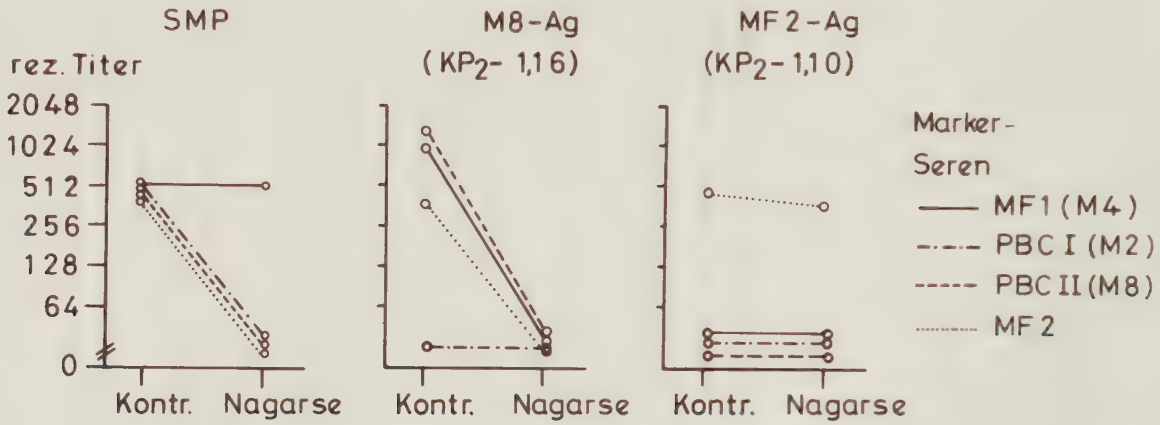


Abb. 5a

Abb. 5b

Abb. 5c

Abb. 5a: Serologische Untersuchungen von SMP vor und nach Nagarsebehandlung mit Markerseren: MF1-Serum (anti-M4 und anti-M2 positiv) reagiert mit dem nagarseresistenten (trypsininsensitiv) M4-Antigen. Die korrespondierenden Antigene von PBC I Seren (anti-M2 positiv) und PBC II Seren (anti-M8 positiv, anti-M4 negativ) reagiert nur vor Enzymbehandlung. Das nagarseresistente MF2-Antigen (siehe Abb. 5c) ist demnach in den SMP nicht enthalten.

Abb. 5b: Untersuchungen des M8-Antigens vor und nach Nagarsebehandlung: Das nagarseresistente M4-Antigen ist in der M8-Fraktion nicht enthalten, da nach Enzymbehandlung anti-M4 positives Serum nicht mehr reagiert. M2-Antigen ist bereits in der Kontrolle negativ. Die neue M8-Antigenspezifität wird durch Nagarse zerstört. Anti-M8 ist auch in MF1- und MF2-Seren enthalten.

Abb. 5c: Nur MF2-Serum reagiert vor und nach Enzymbehandlung mit der MF2-Fraktion (nagarseresistent).

1. Charakterisierung des M8-Antigens

Wurde die das M8-Antigen enthaltende KP2-Fraktion über AH-Sepharose 4B - eine freie Aminogruppen tragende Austauschchromatographie - subfraktioniert, konnte die M8-Aktivität erst bei der hohen Salzkonzentration einer 1-molaren Kaliumchloridlösung eluiert werden (Abb. 6). Weitere Reinigungsversuche über die Austauschchromatographie hinaus waren wegen der Instabilität des Antigens nicht möglich.

Das M8-Antigen ist thermolabil. Sowohl Inkubation in Wärme für eine Stunde bei 56°C als auch Lagerung bei 4°C über mehrere Tage oder mehrmaliges Einfrieren führten zu einer erheblichen Aktivitätseinbuße.

Durch proteolytische Enzyme, wie am Beispiel der Nagarse bereits gezeigt, wird das M8-Antigen zerstört. Mit Einsatz von hohen Konzentrationen an Phospholipase A2, die Phospholipide hydrolysiert, wird die Antigenaktivität nur reduziert. Die Nuclease, eine Exo- und Endo-5'-Phosphodiesterase, die sowohl gegen DNS als auch gegen RNS aktiv ist, beeinflußt die M8-Aktivität nicht (Abb. 7).

Das Molekulargewicht des Antigenkomplexes liegt nach den gelchromatographischen Untersuchungen bei dem Vergleich mit anderen globulären Proteinen in einem Bereich von 340.000 Dalton (Abb. 8a+b). Wurde die M8-Fraktion (Gradient 1.16) einer SDS-PAGE unterzogen, so zeigten sich konstant fünf dichtere Banden und etwa neun schwache Banden (Abb. 9). Vier der dichteren Banden wanderten in einem Molekulargewichtsbereich über 50.000. Eine Bande fand sich bei 45.000 Dalton. Im Vergleich mit einer ATPase-Präparation (M2-Antigen), die in eine dicke Bande bei einem Molekulargewicht von 50.000 und fünf schwächere Banden zerfällt, waren zu der M8-Fraktion keine korrespondierenden Banden nachzuweisen.

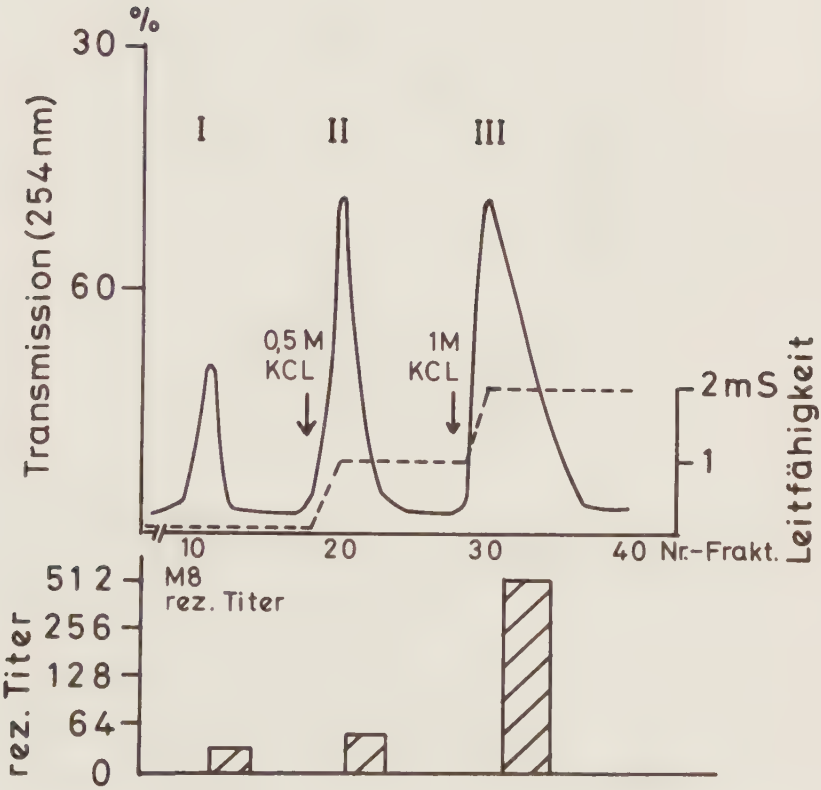


Abb. 6: Reinigung der M8-haltigen KP2-Fraktion über eine AH-Sepharose 4B Austauschchromatographie. Elution des M8-Antigens durch 1 M KCl-Lösung (Peak III)

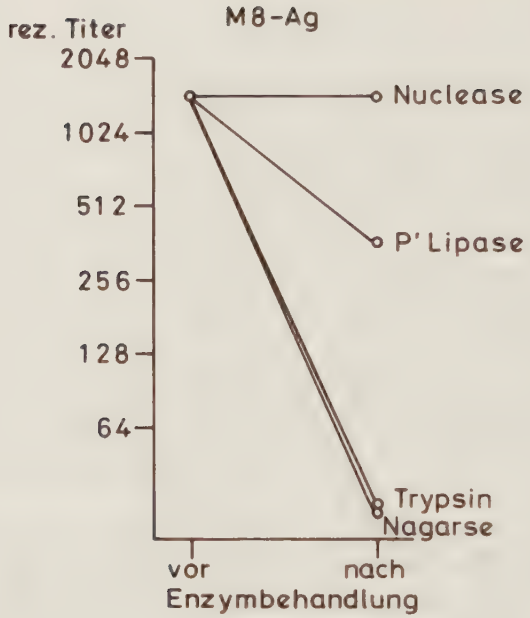
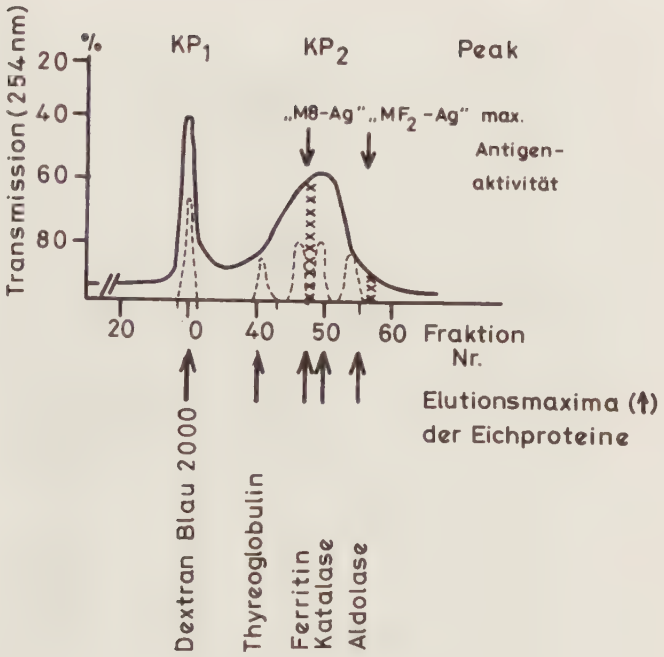


Abb. 7: Antigenaktivität von M8 vor und nach Inkubation mit den Enzymen Nuclease, Phospholipase A2, Trypsin und Nagarse

---

Abb. 8a: Molekulargewichtsbestimmung des M8- und MF2-Antigens mittels Gelchromatographie über Sepharose 6B: Vergleich des Elutionsprofils von KP1 und KP2 (a = M8, b = MF2) mit den Peakmaxima der Referenzproteine.

Abb. 8b: Ermittlung der Molekulargewichte über den K_{av}-Wert (siehe Methoden). Die an den Peakmaxima abgelesenen Elutionsvolumina der Referenzproteine (Abb. 8a) sind als K_{av}-Wert gegen den Logarithmus deren Molekulargewichte aufgetragen. Der K_{av}-Wert von M8- und MF2-Antigen ergibt das Molekulargewicht am Schnittpunkt mit der Geraden.



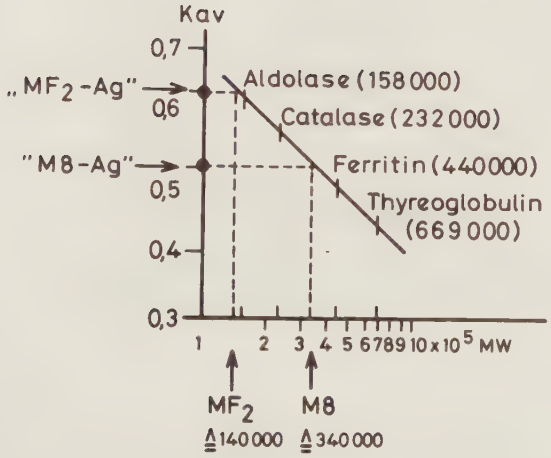


Abb. 8a (oben)
Abb. 8b (unten)

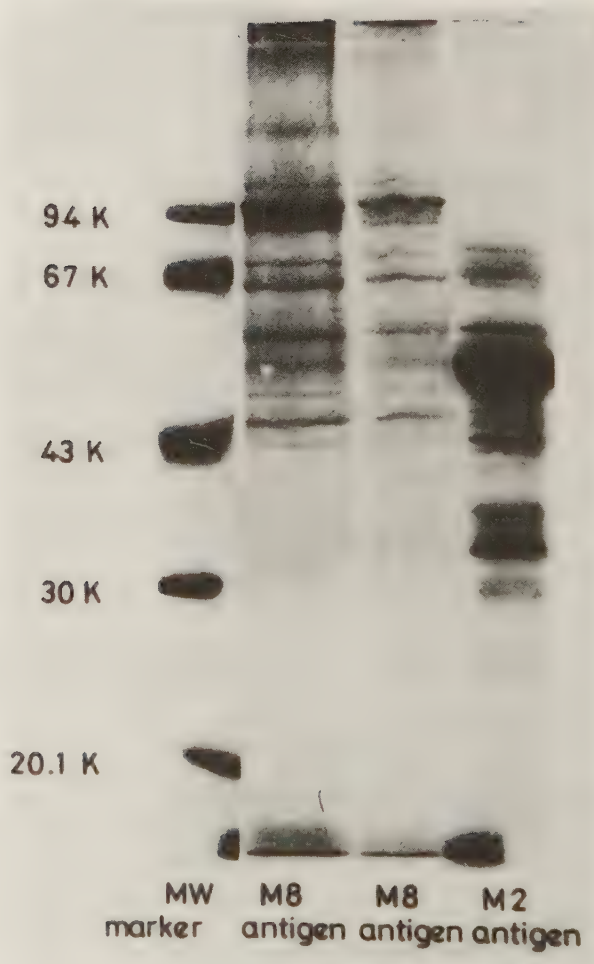


Abb. 9: SDS-PAGE des M8-Antigens (Gradient 1.16). Keine korrespondierende Banden mit der ATPase-Präparation. Markerproteine sind Phosphorylase b (94.000), Albumin (67.000), Ovalbumin (43.000), Carboanhydrase (30.000), Trypsininhibitor (20.100).

2. Isolierung des M8-Antigens aus verschiedenen Organen

Der Versuch, M8-Antigen aus Leber oder Pankreas zu isolieren, gelang nicht. Zwar waren die Elutionsprofile der mit der Nierenpräparation gewonnenen Profile ähnlich - eine Darstellung des M8-Antigens aus diesen Fraktionen war jedoch nicht möglich (Abb. 10). M8 ließ sich auch nicht aus Herzgewebe (vom Rind) isolieren, da immer M2-Antigenkontaminationen enthalten waren. Durch Präparationen von Nieren unterschiedlicher Spezies (Mensch, Schwein, Kaninchen, Ratte) konnte aber gezeigt werden, daß M8 nicht speziesspezifisch ist.

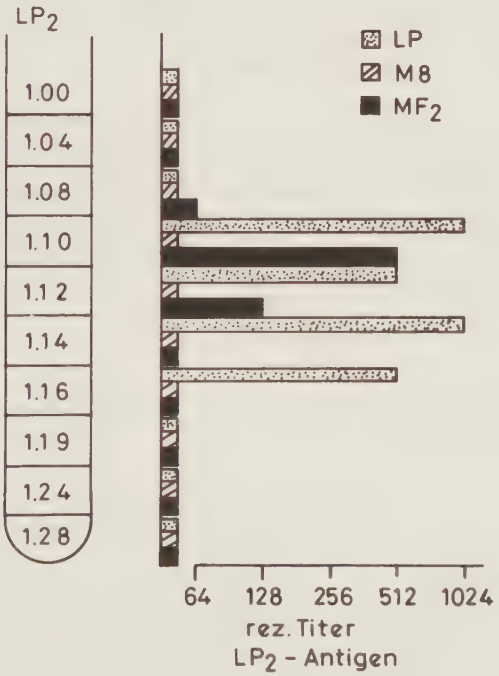


Abb. 10: Saccharosegradientenzentrifugation (18 h, 200.000 g) von Leberüberstand nach Gelchromatographie über Sephadex G 100 und Sepharose 6B (Peak 2 = LP2). Anreicherung des MF2-Antigens in Dichte 1.10. Kontamination mit LP-Antigen bis Gradient der Dichte 1.16.

3. Assoziation des M8-Antigens mit der äußeren Mitochondrienmembran

Um festzustellen, wo das Antigen innerhalb der Zelle lokalisiert ist, wurden M8 positive Antigenfraktionen auf Enzymmarker getestet. Die Succinat-Cytochrom C Reductase, ein Enzym der inneren Mitochondrienmembran, und die rotenoninsensitive NADH-Cytochrom C Reductase der äußeren Membran wurden in verschiedenen Reinigungsstufen der M8-Präparation gemessen. Als Referenzfraktion mit hoher Aktivität beider Enzyme dienten ultraschallbehandelte Mitochondrien. Eine gereinigte Präparation von äußeren Mitochondrienmembranen*, die hohe Aktivität des Enzymmarkers rotenoninsensitive NADH-Cytochrom C Reductase aufweist, wurde als weitere Kontrollfraktion verwendet (Abb. 11).

In Tabelle III sind die Ergebnisse der Markerenzyme und Markerseren nach Austestung mit Mitochondrienfraktionen zusammengefaßt: Ultraschallbehandelte Mitochondrien (105.000 g) enthalten alle komplementbindenden mitochondrialen Antigene M1 bis M6 und M8. In Präparationen von äußeren Mitochon-

*) freundlicherweise von Herrn Stechemesser zur Verfügung gestellt

---

Abb. 11: Markerenzyme der inneren (Succinat-Cytochrom C Reductase) und der äußeren (rotenoninsensitive NADH-Cytochrom C Reductase) Mitochondrienmembran in verschiedenen Reinigungsstufen des M8- und MF2-Antigens. In der KP2-Fraktion und im Dichtegradienten 1.16 (M8) sind nur Enzymaktivitäten der äußeren Membran nachweisbar. Im Dichtegradienten 1.10 (MF2) keine Reaktion mit dem Enzymmarker für äußere und innere Membran. Ultraschallbehandelte Mitochondrien als positive Kontrolle für beide Enzyme und eine Präparation von äußeren Mitochondrienmembranen für NADH-Cytochrom C Reductase.

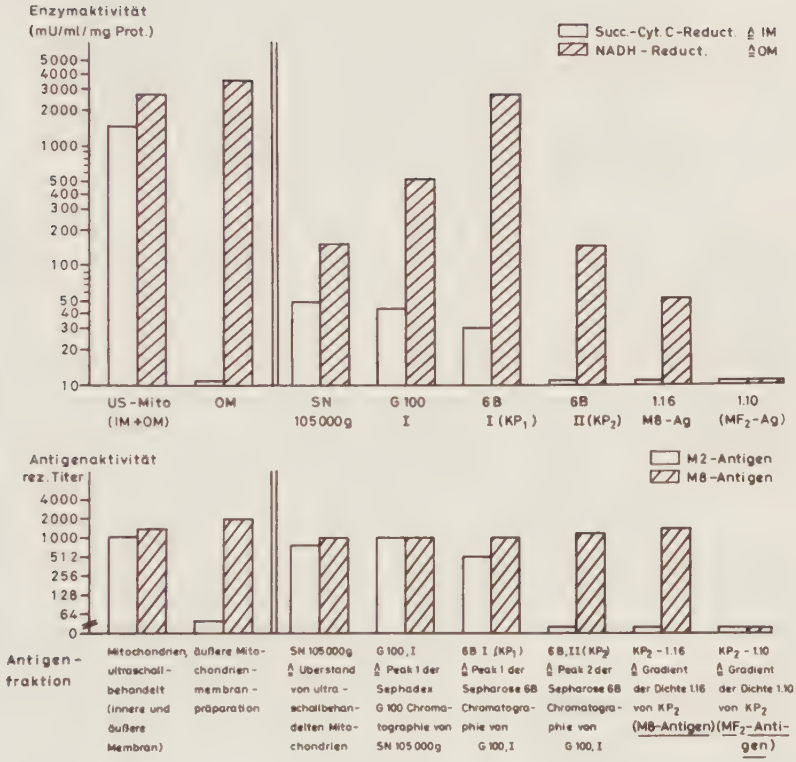

Enzymaktivität
(mU/ml/mg Prot.)
Succ.-Cyt.C-Reduct. ≙ IM
NADH - Reduct. ≙ OM
5000
4000
3000
2000
1000
500
400
300
200
100
50
40
30
20
10
US-Mito (IM+OM)
OM
SN 105000g
G 100 I
6B I (KP1)
6B II (KP2)
1.16 M8-Ag
1.10 (MF2-Ag)
Antigenaktivität
rez. Titer
M2-Antigen
M8-Antigen
4000
2000
1000
512
256
128
64
0
Antigen-fraktion
Mitochondrien, ultraschall-behandelt (innere und äußere Membran)
äußere Mitochondrien-membran-präparation
SN 105000g ≙ Überstand von ultra-schallbehandelten Mitochondrien
G 100, I ≙ Peak 1 der Sephadex G 100 Chromatographie von SN 105000g
6B I (KP1) ≙ Peak 1 der Sepharose 6B Chromatographie von G 100, I
6B, II (KP2) ≙ Peak 2 der Sepharose 6B Chromatographie von G 100, I
KP2 - 1.16 ≙ Gradient der Dichte 1.16 von KP2 (M8-Antigen)
KP2 - 1.10 ≙ Gradient der Dichte 1.10 von KP2 (MF2-Antigen)

Tabelle III: Vergleichende Darstellung der Markerenzyme für innere (Succinat-Cytochrom C-Reductase) und äußere (NADH-Reductase) Mitochondrienmembran und der Markerseren für M2- und M8-Antigen in der Präparation von M8- und MF2-Antigen aus Nierenüberstand. Als Kontrollantigene wurden ultraschallbehandelte Mitochondrien und eine Präparation von äußeren Mitochondrienmembranen verwendet-

		Mito SN (SN 105 000)	OM (Niere)	KP_2 - 1.16 (M8-Ag)	KP_2 - 1.1 (MF_2-A
enzymatische Marker (mU/ml/mg/Prot.)	Succ.-Cyt. C.-Reduct.	+ +	Ø	Ø	Ø
	NADH-Reduct.	+ +	+ +	+ +	Ø
serologische Marker (rez. Titer)	anti - M 1	(+)	Ø	Ø	Ø
	anti - M 2	+ +	Ø	Ø	Ø
	anti - M 3	+ +	+ +	Ø	Ø
	anti - M 4	+ +	+ +	Ø	Ø
	anti - M 5	+ +	+ +	Ø	Ø
	anti - M 6	+ +	+ +	Ø	Ø
	anti - M 7	Ø ← nicht komplementbindend →			Ø
	anti - M 8	+ +	+ +	+ +	Ø
	anti - LKM	+	+	Ø	Ø
	anti - LP	+	Ø	Ø	Ø/+
	anti - MF_2	+ +	Ø	Ø	+ +

+ = Enzymaktivität bis 50 | + = Titer bis 1/128
++ = Enzymaktivität über 50 | ++ = Titer über 1/128

① bei Präp. aus Lebergewebe und Pankreas mit LP assoziiert

drienmembranen sind neben M8 hohe Aktivitäten von M3, M4, M5 und M6 enthalten. M2-Antigen (innere Membran) ist nicht enthalten. Die gereinigte M8-Fraktion aus der Dichtegradientenzentrifugation (d = 1.16) ist frei von den übrigen mitochondrialen Antigenen und serologisch ohne mikrosomale (LKM) Antigenaktivität. Diese M8-Fraktion ist hinsichtlich des Enzymmarkers für äußere Mitochondrienmembran mit der Präparation von äußeren Membranen vergleichbar, da in dieser der Enzymmarker für innere Membranen nicht nachweisbar ist. Die Untersuchungen legen nahe, daß das M8-Antigen mit der äußeren Mitochondrienmembran assoziiert ist. Die innere Membran konnte durch den fehlenden serologisch geführten Nachweis von M2 in äußeren Membranpräparationen und dem reziproken Verhältnis von M8 in M2-Fraktionen als M8-haltiges Kompartiment ausgeschlossen werden.

Da sich MF2 weder in der äußeren Membran nachweisen läßt, noch Enzymmarker für äußere oder innere Mitochondrienmembran in der MF2-Fraktion zu finden sind, muß es sich um eine zu den mitochondrialen Antigenen M1 bis M8 unterschiedliche Antigenspezifität handeln.

4. Präparation und Charakterisierung des MF2-Antigens

Wie bereits im ersten Abschnitt gezeigt, wird das MF2-Antigen aus Nierenüberstand und Gelchromatographie über Sephadex G 100 und Sepharose 6B isoliert. Die Dissoziation von dem M8-Antigen gelingt durch eine Saccharose-Dichtegradientenzentrifugation, bei der sich das MF2-Antigen in dem Gradienten der Dichte 1.10 anreichert (Abb. 4a).

Im Gegensatz zum M8-Antigen konnte das MF2-Antigen auch aus Leber und Pankreas isoliert werden. In diesen Präparationen fand sich das Antigen auch im zweiten Peak des Sepharose 6B-Säulenlaufs (Abb. 12). Mit der Pankreaspräparation konnte

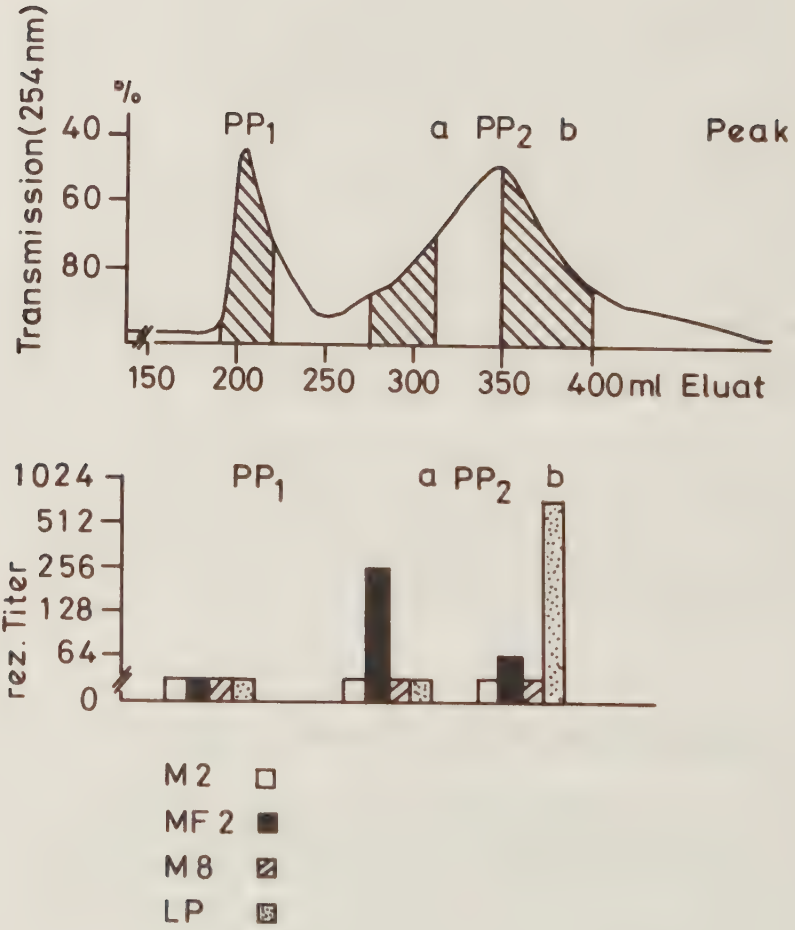

Transmission(254nm)
%
40
60
80
PP1
a PP2 b
Peak
150
200
250
300
350
400ml Eluat
1024
512
256
128
64
0
rez. Titer
PP1
a PP2 b
M 2
MF 2
M 8
LP

Abb. 12

gezeigt werden, daß das mit dem MF2-Antigen angereicherte LP-Antigen von diesem dissoziierbar ist. Wurde MF2-Antigen aus Leber präpariert, ließ sich das LP-Antigen auch nicht durch eine Gradientenzentrifugation abtrennen (Abb. 12). Das MF2-Antigen ist wie das M8-Antigen nicht speziesspezifisch. Präparationen wurden mit menschlichen und tierischen Organen (Schwein, Kaninchen, Ratte) ausgeführt.

Wie bereits in Abbildung 6a-c gezeigt, ist das MF2-Antigen trypsin- und nagarseinsensitiv. Auch Phospholipase A2 und Nuclease bewirken keinen Aktivitätsverlust, so daß Phospholipide oder Nukleinsäuren als Antigendeterminanten unwahrscheinlich sind.

Die Thermolabilität wird an der Aktivitätsabnahme nach einstündiger Inkubation bei 56°C oder bei mehrtägiger Lagerung bei 4°C und bei wiederholtem Einfrieren deutlich.

Durch Vergleich mit anderen globulären Proteinen von definiertem Molekulargewicht konnte das MF2-Antigen auf einen Bereich von etwa 140.000 Dalton eingegrenzt werden (Abb. 8).

In der SDS-Elektrophorese wandert die Hauptbande zwischen den Markern Ovalbumin mit einem Molekulargewicht von 43.000 und Albumin von 67.000. Weitere drei dichtere und mindestens neun schwache Banden weisen auf Kontaminationen oder Untereinheiten hin (Abb. 13).

Die Zuordnung des MF2-Antigens zu einem subzellulären Kompartiment ist letztendlich nicht gelungen. Es scheint jedoch zu den Mitochondrien klar dissoziiert, da in gereinigten

---

Abb. 12: Gelchromatographie des 1. Peaks von Pankreasüberstand aus Sephadex G100 über Sepharose 6B. Trennung des MF2-Antigens (1. Teil von Peak 2 = PP 2a) von dem LP-Antigen (2. Teil von Peak 2 = PP 2b). Nachweis der Antigenaktivität mit Markerseren.

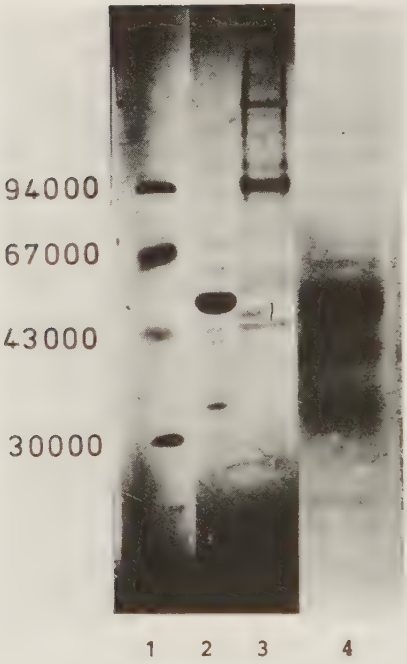


Abb. 13: SDS-PAGE von MF2-Antigen (4). Vergleich mit einer ATPase-Präparation (2) und dem M8-Antigen (3). Molekulargewichtsmarker (1) von 94.000 bis 30.000 Dalton.

Präparationen weder serologische noch enzymatische Marker für Mitochondrien nachgewiesen werden konnten. Serologisch wurden in MF2-Fraktionen auch keine mikrosomalen Aktivitäten (LKM-Serum) gefunden (Tab. III).

Wie aus den bisherigen Untersuchungen zur Charakterisierung von M8 gezeigt, sind MF-Seren, die mit dem trypsin- bzw. nagarseresistenten Antigen M4 reagieren, nicht identisch mit Seren, die mit dem MF2-Antigen reagieren (Abb. 5a-c). MF-Seren sind demnach dadurch gekennzeichnet, daß sie neben dem M2-Antikörper und dem M8-Antikörper entweder den M4-Antikörper gegen ein Bestandteil der äußeren Mitochondrienmembran gerichtet oder gegen das hier vorgestellte MF2-Antigen enthalten.

II. KLINISCHE RELEVANZ DER VERSCHIEDENEN AMA-PROFILE

1. Klinische Beobachtungen von PBC-Fällen mit Anti-M8

Unter 66 Patienten mit einer PBC, die alle M2-Antikörper hatten, fanden sich 25 PBC-Fälle mit Antikörpern gegen das M8-Antigen. Von 37 MF-SEren reagierten alle mit diesem Antigen. Zwischen den M8-positiven PBC-Seren und MF-Seren bestanden in der KBR keine signifikanten Titerunterschiede (Abb. 14).

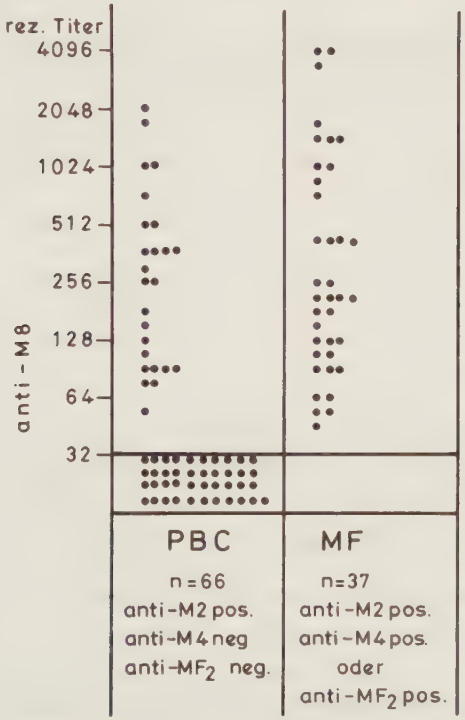


Abb. 14: Antikörpertiter von 66 PBC- und 37 MF-Seren in der KBR mit dem M8-Antigen.

In Anti-M8 positiven PBC-Seren waren häufiger Antikörper gegen glatte Muskulatur (SMA) und Kerne (ANA) zu finden als

bei den anti-M8 negativen PBC-Seren. Noch häufiger waren SMA und ANA bei MF-Seren (Tab. IV).

Tabelle IV:

Diagnose	Anzahl d. Pat.	SMA	ANA
PBC I	41	17 (41%)	6 (15%)
PBC II (M8 positiv)	25	15 (60%)	6 (24%)
MF 1	27	22 (81%)	9 (33%)
MF 2	10	7 (70%)	4 (40%)

Bei der Analyse der klinisch-chemischen Laborparameter wie alkalische Phosphatase, Bilirubin, GOT, Gamma-Globuline, IgM und IgG fielen keine signifikanten Unterschiede zwischen den anti-M8 positiven und negativen PBC-Fällen auf.

Die Verlaufsbeobachtung eines repräsentativen PBC-Patienten mit Antikörpern gegen das M8-Antigen (Abb. 15) zeigt keine Korrelation der Titerhöhe mit der Krankheitsaktivität, gemessen an der Erhöhung der alkalischen Phosphatase, den Transaminasen und der Immunglobuline. Die Therapie mit Steroiden senkte zwar die Immunglobulinerhöhung vorübergehend, konnte jedoch nicht das für die Erkrankung charakteristische Ansteigen der alkalischen Phosphatase unterdrükken.

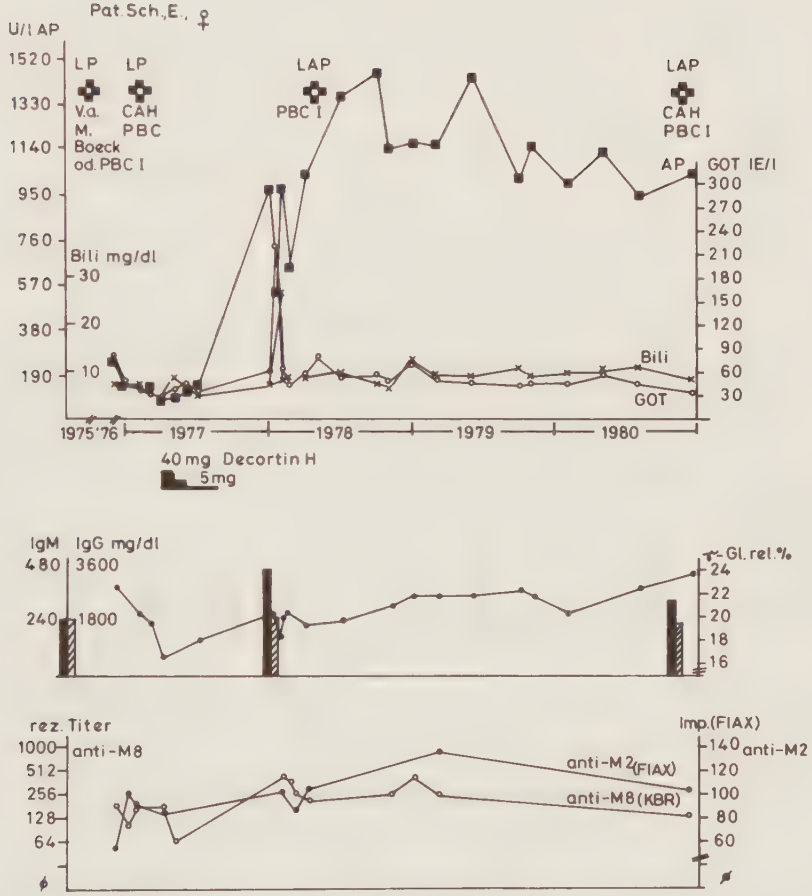


Abb. 15: Verlaufsbeobachtung einer Patientin mit PBC und Nachweis von M2- und M8-Antikörpern.

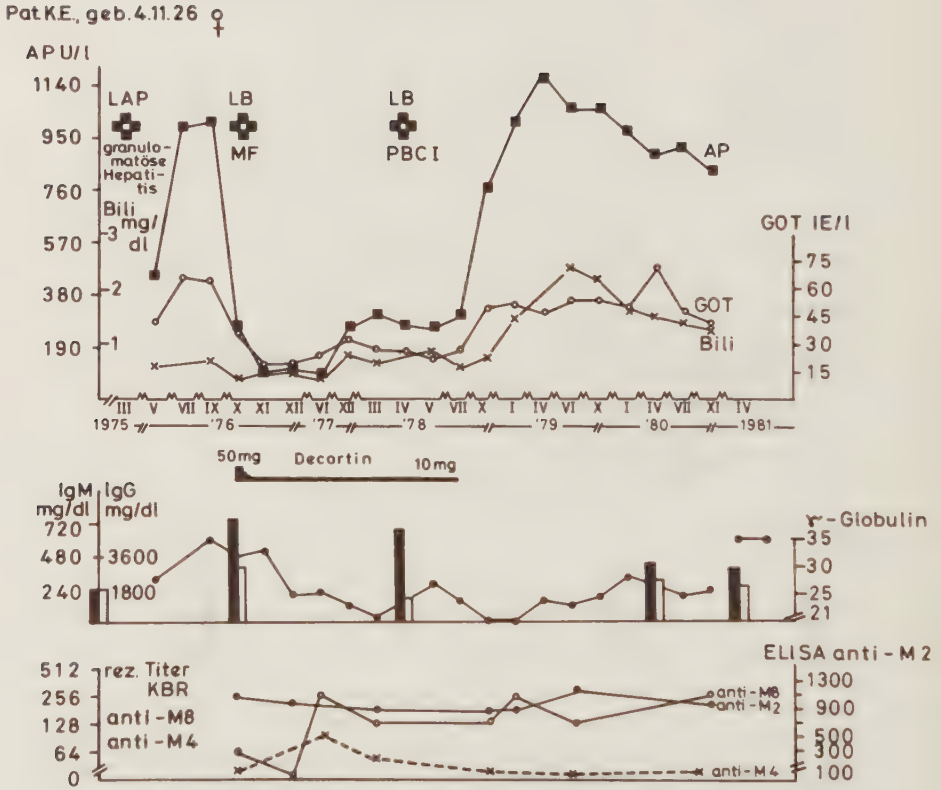


Abb. 16: Verlaufsbeobachtung einer Patientin mit Mischform (Anti-M2, Anti-M4 und Anti-M8 positiv).

In Abbildung 16 ist der Krankheitsverlauf eines anti-M8 positiven MF-Falles dargestellt, der vorübergehend mit Steroiden behandelt worden war. Das Ansprechen auf die Therapie wird an dem Abfall der pathologisch erhöhten Laborparameter deutlich.

2. Differenzierung der MF2-Seren von MF1-Seren

Zehn der 37 klinisch als MF klassifizierten Patienten waren anti-MF2 positiv. Keines der anti-MF2 positiven Seren hatte M4-Antikörper, das heißt, daß die klinisch definierten Mischformen durch das reziproke Vorkommen zweier verschiedener Antikörper definiert werden (Tab. V).

Tabelle V:

	Anzahl Pat.	M2-AK (ATPase assoziiert)	M8-AK (KP_2 -1,16)	MF1-AK (M4)	MF2-AK (KP_2 -1,10)
		% positiv			
PBC	66	100	38	0	0
MF1	27	100	100	100	0
MF2	10	100	100	0	100

Bei acht der zehn Patienten lautete die histologische Diagnose, überwiegend durch mehrfache Biopsien kontrolliert, CAH oder postnekrotische Leberzirrhose (Tab. VI). Fünf dieser acht Patienten zeigten während des Verlaufs im histologischen Untersuchungspräparat auch Merkmale einer PBC. Als histologische Erstdiagnose wurde meist eine CAH festgestellt. Bei den restlichen zwei Patienten, die nur einmal biopsiert wurden, fand sich eine PBC und eine grobknotige Leberzirrhose. Bei dem einen PBC-Fall sprachen die Laboruntersuchungen - Erhöhung der Immunglobuline von der IgG- und IgM-Klasse - für eine MF.

In Abbildung 17 ist der Krankheitsverlauf eines MF-Patienten mit anti-MF2 dargestellt. Die schwankenden Titerhöhen des MF2-Antikörpers, die andeutungsweise der Gammaglobulinerhöhung folgen, legen die Vermutung nahe, daß MF2-Antikörper die Krankheitsaktivität widerspiegeln und durch immunsuppressive Therapien beeinflußt werden. Die Antikörpertiter gegen das M2-Antigen sind konstant, zeigen also keine Korrelation mit der klinischen Krankheitsaktivität, wie auch der M8-Antikörper.

Sind die AMA-positiven Seren mit Hilfe der Immunfluoreszenz erfaßt, läßt sich das Vorliegen einer cholestatischen Lebererkrankung mit Hilfe des ATPase assoziierten Antigens (M2-Antigen) beweisen (Tab. V).

Die PBCI-Fälle (anti-M8 negativ) sind durch das Fehlen des M8-Antikörpers definiert. Der M8-Antikörper ist jedoch auch bei allen MF-Seren nachzuweisen.

MF1-Seren reagieren im Gegensatz zu den PBC-Seren (anti-M8 positiv und negativ) mit dem M4-Antigen. MF2-Seren erkennen das für sie spezifische MF2-Antigen.

Die tatsächlichen Häufigkeiten der Mitochondrienantikörper sind in Tabelle V verzerrt, da bei den vorliegenden Untersuchungen Seren von ausgewählten Patienten mit klinisch be-

Tabelle VI: Histologische Diagnosen der MF-Patienten mit MF2-Antikörpern. In den meisten Fällen lagen Mehrfachbiopsien vor.

Name	Geburtsdatum	Histologische Diagnose	Anzahl Histol.
B.G.	26.05.19	CAH/mikronod. Zirrh.	1
B.H.	25.09.99	CAH CAH/postnekrot. LC CAH IIb CAH/postnekrot. LC postnekrot. LC + PBC I mittelgrad. aktive LC postnekrot. LC nach CAH/PBC	7
D.E.	08.09.32	CAH CAH + PBC II Kombination CAH/PBC	3
G.J.	20.01.24	chron. Hepatitis PBC I - II PBC II - III postnekrot. LC	4
G.H.	01.05.24	postnekrot. LC	1
K.L.	29.07.18	PBC (IgG+M ↑, gamma-Gl. ↑↑)	1
M.A.	04.10.12	grobknot. LC (gamma-Gl. ↑↑)	1
P.M.	28.10.25	CAH/kleinknot. LC PBC II	2
S.H.	23.09.14	CAH PBC I - II CAH PBC	4
S.-P.M.	09.10.37	CAH CAH	2

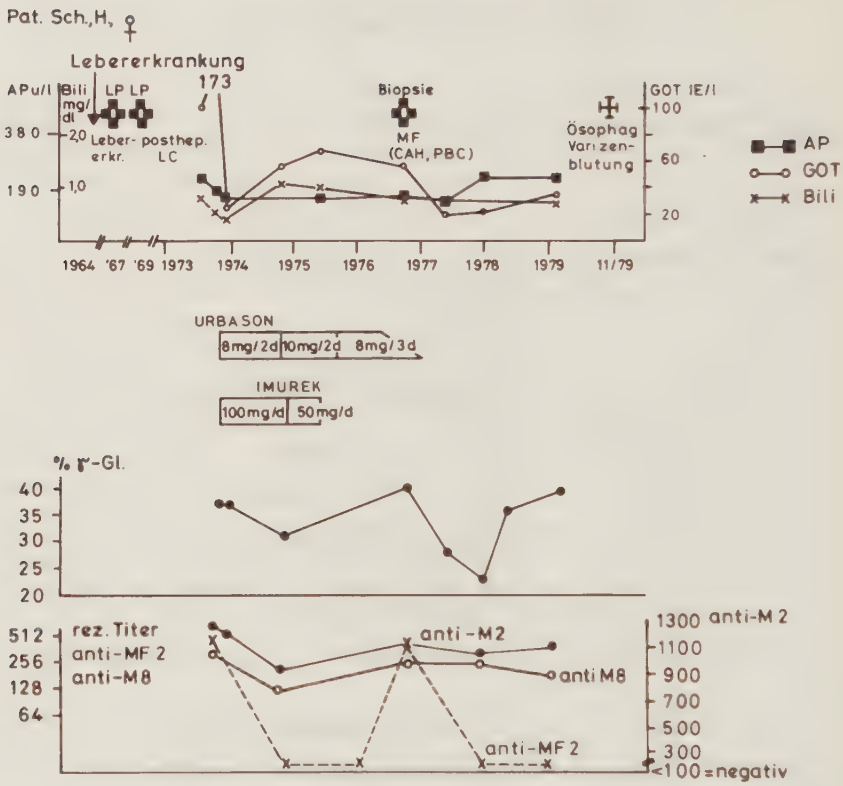


Abb. 17: Verlauf bei einer Patientin mit cholestatischer CAH und serologischem Nachweis von Anti-M2, Anti-M8 und Anti-MF2.

ziehungsweise histologisch definiertem Krankheitsbild und Seren mit eindeutig positiven Antikörpertitern zur Testung gelangten. Die Frequenz von PBC-Fällen ist im Vergleich zu den MF-Fällen wesentlich höher anzusetzen.

Anmerkung:
Die Untersuchungen wurden inzwischen an einem großen Kollektiv (500 Seren) fortgesetzt und haben gezeigt, daß ca. 40 % der Seren anti-M8 positiv sind und MF-Fälle mit einer Häufigkeit von 20 % bei cholestatischen Lebererkrankungen mit Mitochondrienantikörpern vertreten sind.

D. DISKUSSION

Mit einer Präparation eines Nierenüberstands ist es gelungen, ein Antigen zu isolieren, das sich nicht deutlich von den bisher beobachteten Antigenen M2 und M4 unterscheidet. Wie das M2-Antigen wird M8 durch Proteasen zerstört. In der elektrophoretischen Auftrennung zeigt es bei dem Vergleich mit dem ATPase-assoziierten Antigen (M2) keinerlei Ähnlichkeiten. Auf Grund von serologischen und enzymatischen Markern muß M8 am ehesten in die äußere Mitochondrienmembran lokalisiert werden. Dafür spricht, daß es in einer Präparation von äußeren Mitochondrienmembranen in hoher Aktivität gefunden wird. Als Hinweis für die Assoziation mit äußerer Membran kann auch gelten, daß im M8-Antigen das Markerenzym Rotenoninsensitive NADH-Cytochrom C Reductase der äußeren Membran und nicht das für die innere Membran spezifische Enzym Succinat-Cytochrom C Reductase enthalten ist. Nicht auszuschließen ist, daß M8 mit mikrosomalen Antigenen assoziiert ist, obwohl die gereinigte M8-Fraktion mit einem mikrosomalen Antikörper (LKM) nicht reagierte. Wegen der strukturellen Ähnlichkeiten von äußeren Mitochondrienmembranen und Mikrosomen wird sich diese Frage mit den uns zur Verfügung stehenden Methoden nicht weiter abklären lassen.

M8 ist wahrscheinlich nicht organspezifisch. Da alle M8-positiven Seren auch den M2-Antikörper enthalten, ist es schwierig, die Frage der Organspezifität zu klären. Neuere Untersuchungen haben jedoch gezeigt, daß das M8-Antigen auch aus einer Leberfraktion ohne M2-Kontamination darstellbar ist (Berg et al., 1985).

Problematisch war die Handhabung des Antigens wegen dessen Instabilität sowohl in Wärme als auch bei längerer Lagerung in Kälte. Der Antigenkomplex hat nach glechromatographischen Untersuchungen ein Molekulargewicht von etwa 340.000. Durch Proteasen und auch in geringem Ausmaß durch Phospholipase

wird die Antigenaktivität reduziert. Diese Befunde lassen indirekt auf die Beteiligung von Phospholipiden am Antigenaufbau schließen. Solche Protein-Phospholipid-Komplexe - als Bausteine von Membranen bekannt - können durch Alterationen dissoziiert oder mit einer Hydrolyse einhergehen und dadurch zu einer Konformationsänderung der Antigendeterminanten führen (Berg et al., 1969; Araki, 1977). Der M8-Antigenkomplex zerfällt in der Elektrophorese in viele Untereinheiten. Das eigentliche Antigen kann mit dieser Methode nicht festgestellt werden. Versuche, mit Hilfe der Immunoblot-Technik die aktiven Untereinheiten zu definieren, waren bisher erfolglos (unveröffentlichte Beobachtungen).

Der Nachweis von M8-Antikörpern hat klinische Relevanz. So konnten bei 25 von 66 morphologisch und klinisch eindeutig definierten PBC-Patienten M8-Antikörper nachgewiesen werden. Die retrospektive Analyse einiger PBC-Fälle mit M8-Antikörpern zeigte, daß diese Patienten schneller eine Zirrhose entwickelten als anti-M8 negative Patienten (Weckenmann et al., 1982). Bemerkenswert ist auch, daß bei den M8-positiven PBC-Seren häufiger SMA und ANA auftreten. Klinisch-chemisch unterscheiden sich die Parameter der M8-positiven und -negativen Fälle nicht. Nach den vorläufigen Untersuchungen kann die Gruppe der anti-M2 und anti-M8 positiven Patienten zwischen den anti-M2 positiven/anti-M8 negativen und den anti-M2/anti-M4/anti-M8 positiven (MF) Patienten eingeordnet werden.

Inwieweit diese serologische Klassifikation der PBC nach verschiedenen AMA-Profilen auch therapeutisch relevant ist, muß vorerst offen bleiben. Retrospektive Analysen einiger anti-M2/anti-M8 positiver Patienten, die unter der Annahme einer CAH ursprünglich immunsuppressiv behandelt wurden, legen nahe, daß es neben therapieresistenten auch therapiesensible Fälle gibt, die auf Gaben von Steroiden mit einem Abfall der Immunglobuline und der alkalischen Phosphatase reagieren.

Die Bedeutung des Nachweises von unterschiedlichen Antikörperprofilen wird auch durch Untersuchungen hinsichtlich der klinischen Relevanz des MF2-Antikörpers unterstrichen, die fast ausschließlich in Assoziation mit Anti-M8 beobachtet werden und bei denen histologisch das Bild der CAH (Prädominanz von peacemeal-Nekrosen) vorherrschte. So konnte bei 10 von 37 Patienten der MF2-Antikörper beobachtet werden. Neun von 10 Patienten hatten morphologisch eine CAH. Erst in Nachuntersuchungen konnten vom Pathologen auch Veränderungen an den Gallengängen beobachtet werden, die im Sinne einer primär biliären Zirrhose zu interpretieren waren.

Methodisch ist die Reindarstellung des MF2-Antigens aufwendig und auch schwierig, da das Antigen sehr labil ist und während der Präparation an Aktivität abnimmt. Obwohl MF2 wie M3 und M4 trypsininsensitiv ist, ist es bisher nicht gelungen, MF2 mit dem mitochondrialen Antigensystem in Verbindung zu bringen (auch nicht mit der äußeren Membran). In Präparationen von Plasmamembranen, die noch reich an Kontamination mit Mikrosomen waren, konnten keine Antigenaktivitäten von MF2 festgestellt werden (eigene Beobachtungen, nicht beschrieben). Nach den Trenneigenschaften und der Assoziation mit dem LP-Antigen, einem wahrscheinlich cytoplasmatischen Antigen aus Leber und Pankreas (Berg u. Stechemesser, 1981), könnte das MF2-Antigen auch aus dem Cytoplasma stammen. Bei der Reinigung fiel die starke Assoziation der Antigenaktivität mit den gelbgefärbten Flavoproteinen auf. Die Spezifität des Antigens wird bei der Testung mit den mitochondrialen Markern Anti-M1 bis Anti-M8 und mit dem LKM-Serum deutlich, mit denen keine Kreuzreaktionen eintraten. Interessant ist auch die Beobachtung, daß Anti-MF2-Antikörper nicht gleichzeitig mit Anti-M4-Antikörpern in Seren von PBC-Patienten beobachtet werden, das heißt, daß Seren mit M4-Antikörpern das Vorhandensein von MF2-Antikörpern ausschließen.

Zusammenfassend können diese verschiedenen Antikörper dahin interpretiert werden, daß das Auftreten zusätzlicher Antikörperspezifitäten neben dem M2-Antikörper auf eine Aktivierung des immunologischen Prozesses und damit der entzündlichen Reaktion am Leberparenchym hinweist und insofern als prognostischer Indikator für die Beurteilung des natürlichen Verlaufs einer PBC herangezogen werden können (Baum u. Berg, 1981; Berg et al., 1981). Weitere Verlaufsstudien und retrospektive Analysen sind notwendig, um einmal dieses Konzept zu erhärten, zum anderen, um festzustellen, inwieweit die Erkennung dieser unterschiedlichen Antikörperprofile von Bedeutung ist, das Ansprechen der PBC auf eine immunsuppressive Therapie vorhersagen zu können.

E. ZUSAMMENFASSUNG

Der serologische Nachweis von Mitochondrienantikörpern ist neben der histologischen Gewebsuntersuchung die wesentliche Stütze in der Diagnostik der primär-biliären Zirrhose (PBC). Neben dem bekannten für die PBC spezifischen M2-Antikörper, der mit einem trypsin sensitiven Antigen der inneren Mitochondrienmembran reagiert, und dem M4-Antikörper, der bei einer kleinen Untergruppe der PBC (Mischform) vorkommt und mit einem trypsininsensitiven Antigen der äußeren Membran reagiert, konnten neue Antikörperspezifitäten entdeckt werden.

Aus einem Gewebsüberstand aus Niere konnte durch Gelchromatographie und Saccharosegradientenzentrifugation ein trypsinsensitives Antigen isoliert werden - im folgenden M8-Antigen genannt -, gegen das bei etwa 40 % der PBC-Seren Antikörper zu finden sind. Dieses in der äußeren Membran lokalisierte Antigen hat keine Spezies- und wahrscheinlich auch keine Organspezifität.

In Seren von 103 Patienten mit PBC, die alle den M2-Antikörper hatten, reagierten 25 von 66 Patienten mit klassischer PBC und alle Patienten mit Mischform (anti-M4 positiv) mit dem M8-Antigen. Vorläufige Beobachtungen deuten an, daß der Krankheitsverlauf bei Patienten mit M8-Antikörpern progredienter ist als bei anti-M8 negativen Fällen (Weckenmann et al. 1982).

In der Arbeit wird außerdem ein Antigen vorgestellt, das aus Überständen von Leber, Pankreas und Niere durch Gelchromatographie isoliert werden kann und wahrscheinlich nichtmitochondrialen Ursprungs ist. In 10 Seren von 37 Mischform-Fällen wurden gegen dieses Antigen hochspezifische Antikörper - MF2-Antikörper genannt - gefunden. Der für die Mischform spezifische M4-Antikörper schließt das Vorkommen

von Anti-MF2 aus. Es gibt Anzeichen, daß Patienten mit diesem bei der PBC eher selten vorkommenden Antikörper von einer immunsuppressiven Therapie profitieren könnten.

F. LITERATURVERZEICHNIS

Addison, T., W. Gull: On a certain affection of the skin vitiligoidea-a-plana, b-tuberosa. Guy's Hosp. Rep. 7 (1851) 265-277

Araki, T.: Freezing injury in mitochondrial membranes. II. Degradation of phosphilipid in rabbit liver mitochondria during freezing and storage at low temperatures. Cryobiology 14 (1977) 151-159

Baum, H., P.A. Berg: The complex nature of mitochondrial antibodies and their relation to primary biliary cirrhosis. Sem. in Liver Disease Vol. 1, 4 (1981) 309-321

Berg, P.A.: Klinik und Immunologie der autoimmunen chronisch aktiven Hepatitis und der primär biliären Zirrhose. Immun. Infekt. 10 (1982) 3-14

Berg, P.A., H. Baum: Serology of primary biliary cirrhosis. Springer Seminars Immunopathol. 3 (1980) 355-373

Berg, P.A., T. Binder: Demonstration of mitochondrial antibodies in sera from patients with chronic liver diseases reacting with two different types of complement fixing antigens. Chronic Hepatitis. Int. Symp. Monte Catini 1975 (Gentellini P., Popper H., Theodori U., eds.) Karger Basel 1976, 79-85

Berg, P.A., J.C. Homberg, G.F. Bottazzo, D. Doniach: Clinical significance of mitochondrial antibodies in relation to liver disease. Lancet II (1981) 4169-4170

Berg, P.A., J.M. Roitt, D. Doniach, H.M. Cooper: Mitochondrial antibodies in primary biliary cirrhosis. IV. Significance of membrane structure for the complement fixing antigen. Immunology 17 (1969) 281-293

Berg, P.A., J.M. Roitt, D. Doniach, R.W. Horne: Mitochondrial antibodies in primary biliary cirrhosis. III. Charakterization of the inner-membrane complement fixing antigen. Clin. Exp. Immunol. 4 (1969) 511-525

Berg, P.A., E. Stechemesser, J. Strienz: Hypergammaglobulinämische chronische aktive Hepatitis mit Nachweis von Leber-Pankreas-spezifischen komplementbindenden Autoantikörpern. Verh. Dtsch. Ges. Inn. Med. 87 (1981) 921-927

Berg, P.A., P. Weber, J. Oehring, J. Lindenborn-Fotinos, E. Stechemesser: Significance of different types of mitochondrial antibodies in primary biliary cirrhosis. In: H. Brunner and H. Thaler: Hepatology: A Festschrift for Hans Popper. New York, Raven Press (1985) 231-241

Berg, P.A., K.H. Wiedmann, T. Sayers, G. Klöppel, H. Lindner: Serological classification of chronic cholestatic liver disease by use of two different types of antimitochondrial antibodies. Lancet II (1980) 1329-1332

Bradford, M.M.: A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. Anal. Biochem. 72 (1976) 248-254.

Christensen, E., J. Crowe, D. Doniach, H.Popper, L. Ranek, J. Rodes, N. Tygstrup, R. Williams: Clinical pattern and course of disease in primary biliary cirrhosis based on an analysis of 236 patients. Gastroenterology 78 (1980) 236-246

Crowe, J.P., E. Christensen, J. Butler, P. Wheeler, D. Doniach, J. Keenan, R. Williams: Primary biliary cirrhosis: The prevalence of hypothyreoidism and its relationship to thyroid antibodies and Sicca syndrome. Gastroenterology 78 (1980) 1437-1441

Dauphinee, J.A., J.C.Sin clair: Primary biliary cirrhosis. Can. Med. Assoc. J. 61 (1949) 1-6

Epstein, O., R.W.G. Chapman, G. Lake-Bakaar, A.Y. Foo, S.B. Rosalki, S. Sherlock: The pancreas in primary biliary cirrhosis and primary sclerosing cholangitis. Gastroenterology 83 (1982) 1177-1182

Epstein, O., H.C. Thomas, S. Sherlock: Primary biliary cirrhosis is a dry gland syndrome with features of chronic graft-versus-host disease.Lancet I (1980) 1166-1168

Geubel, A.P., A.H. Baggenstoss, W.H.J. Summerskill: Responses to treatment can differentiate chronic active liver disease with cholangitic features from the primary biliary cirrhosis syndrome. Gastroenterology 71 (1976) 444-449

Golding, P.L., R. Brown, A.M.S. Mason, E. Taylor: 'Sicca complex' in liver disease. Brit. Med. J. 4 (1970) 340-342

Hamlyn, A.N., P.A. Berg; Haemagglutinating anti-actin antibodies in acute and chronic liver disease. Gut 21 (1980) 311-317

Homberg, J.C., N. Stelly, J. Andreis, N. Abuaf, F. Saadoun, J. Andre: A new antimitochondria antibody (anti-M6) in iproniazid-induced hepatitis. Clin. Exp. Immunol. 47 (1982) 93-102

James, O., A.F. Macklon, A.J. Watson: Primary biliary cirrhosis - a revised clinical spectrum. Lancet (1981) 1278-1281

James, S.P., J.M. Vierling, W. Strober: The role of the immune response in the pathogenesis of primary biliary cirrhosis. Seminars in liver disease 1 (1981) 322-337

Kato, Y., K. Suzuki, M. Kumagai, K. Nishimura, H. Miyamori, K. Kobayashi, N. Hattori, Y. Nakanuma: Familial primary biliary cirrhosis. Am. J. Gastroenterol. 75 (1981) 188-191

Klein, R., B. Maisch, K. Kochsiek, P.A. Berg: Demonstration of organ specific antibodies against heart mitochondria (anti-M7) in sera from patients with some forms of heart diseases. Clin. Exp. Immunol. 58 (1984) 283-292

Klöppel, G., M. Kirchhoff, P.A. Berg: Natural Course of PBC: I. A morphological, clinical and serological analysis of 103 cases. Liver 2 (1982) 141-151

Klöppel, G., G. Seifert, H. Lindner, R. Dammermann, H.J. Sack, P.A. Berg: Histopathological features in mixed types of chronic aggressive hepatitis and primary biliary cirrhosis. Correlations of liver histology with mitochondrial antibodies of different specificity. Virchows Arch. A. Path. Anat. and Histol. 373 (1977) 143-160

Labro, M.T., M.C. Andrieu, M. Weber, J.C.Homberg: A new pattern of non-organ- and non-species-specific anti-organelle antibody detected by immunofluorescence: The mitochondrial antibody number 5. Clin. Exp. Immunol. 31 (1978) 357-366

Lämmli, U.: Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227 (1970) 680-685

Lindenborn-Fotinos, J., T.J. Sayers, P.A. Berg: Mitochondrial antibodies in primary biliary cirrhosis. VI. Association of the complement-fixing antigen with a component of the mitochondrial F1-ATPase complex. Clin. Exp. Immunol. 50 (1982) 267-274

Long, R.G., P.J. Scheuer, S. Sherlock: Presentation and course of asymptomatic primary biliary cirrhosis. Gastroenterology 72 (1977) 1204-1207

Lowry, O.H., M.J. Rosebrough, A.L. Farr, R.J. Randall: Protein measurement with the Folin phenolreagent. J. Biol. Chem. 193 (1951) 265-275

Mac Farlane, J.G., B.M. Wojcicka, D.C. Tsantoulas, B.C. Portmann, A.L.W.F. Eddlestone, R. Williams: Leucocyte migration inhibition in response to biliary antigens in primary biliary cirrhosis, sclerosing cholangitis, and other chronic liver diseases. Gastroenterology 76 (1979) 1333-1340

Mac Farlane, J.G., B.M. Wojcicka, G.M. Zucker, A.L.W.F. Eddleston, R. Williams: Purification and characterization of human liver-specific membrane lipoprotein (LSP). Clin. Exp. Immunol. 27 (1977) 381-390

Mac Sween, R.N.M., P.A. Berg: Autoimmune diseases of the liver. In: Ferguson A., Mac Sween R.N.M. (eds.): Immunological aspects of the liver and gastrointestinal tract. MTP-Press, Lancester (1976) 345-386

Marx, W.J., D.J. O'Connell: Arthritis of primary biliary cirrhosis. Arch. Intern. Med. 139 (1979) 213-216

Munoz, L.E., H.C. Thomas, P.J. Scheuer, D. Doniach, S. Sherlock: Is mitochondrial antibody a diagnostic marker of primary biliary cirrhosis? Gut 22 (1981) 136-140

Neuberger, J., B. Portmann, B.R.D. Mac Dougall, R.Y. Caline, R. Williams: Recurrence of primary biliary cirrhosis after liver transplantation. N. Engl. J. Med. 306 (1982) 1-4

Popper, H., F. Paronetto: Clinical, histological and immunopathologic features of primary biliary cirrhosis. Springer Semin. Immunopathol. 3 (1980) 339-354

Potter, B.J., E. Elias, H.C. Thomas, S. Sherlock: Complement metabolism in chronic liver disease - catabolism of C1q in chronic active liver disease and primary biliary cirrhosis. Gastroenterology 78 (1980) 1034-1040

Reynolds, T.B., E.K. Denison, H.D. Frankl. F.L. Liebermann, R. L. Peters: Primary biliary cirrhosis with scleroderma, Raynaud's phenomenon and teleangiektasia. Am. J. Med. 50 (1971) 302-312

Rizzetto, M., G. Swana, D. Doniach: Microsomal antibodies in active chronic hepatitis and other disorders. Clin. Exp. Immunol. 15 (1973) 331-344

Roitt, J.M., D. Doniach: WHO manual for autoimmune serology. WHO Monograph Series, Geneva (1969)

Rubin, E., F. Schaffner, H. Popper: Primary biliary cirrhosis. Chronic non suppurative destructive cholangitis. Amer. J. Pathol. 46 (1965) 387-407

Sayers, T.J., T. Binder, P.A. Berg: Heterogenity of antimitochondrial antibodies: characterization and separation of the antigen associated with the pseudolupus erythematodes syndrome. Clin. Exp. Immunol. 37 (1979) 68-75

Scheuer, P.J.:Primary biliary cirrhosis. Proc. Roy. Soc. Med. 60 (1967) 1257-1260

Sherlock, S.: Primary biliary cirrhosis: critical evaluation and treatment policies. Scand. J. Gastroent. 17 (1982) 63-74

Sherlock, S., P.J. Scheuer, The presentation and diagnosis of 100 patients with primary biliary cirrhosis. N. Engl. J. Med. 289 (1973) 674-678

Sottocasa, G.L., B. Kuylenstierna, L. Ernster, A. Bergstrand: An electron-transport system associated with the outer membrane of liver mitochondria. J. Cell Biol. 32 (1967) 415-438

Strienz, J.: Klinik and Serologie einer AMA-positiven cholestatisch verlaufenden chronischen Lebererkrankung mit Nachweis von komplementbindenden Autoantikörpern gegen das Mischform-Antigen II. Inaugural-Dissertation (1983) Tübingen

Thomas, H.C., R. Holden, J. Verrier-Jones, D.B. Peacock: Immune response to Ø X 174 in man. Primary and secondary antibody production in primary biliary cirrhosis. Gut 17 (1976) 844-848

Tornay, A.S.: Primary biliary cirrhosis. Natural history. Am. J. Gastroent. 73 (1980) 223-226

Walker, J.G., D. Doniach, J.M. Roitt, S. Sherlock: Serological tests in diagnosis of primary biliary cirrhosis. Lancet I (1965) 827-831

Wands, J.R., J.L. Dienstag, A.K. Bhan, E.K. Feller, K.J. Isselbacher: Circulating immune complexes and complement activation in PBC. N. Engl. J. Med. 298 (1978) 233-237

Weckenmann, U., P. Weber, E. Stechemesser, G. Klöppel, P.A. Berg: Nachweis von Antikörpern gegen ein cytoplasmatisches Antigen bei Patienten mit einer primär biliären Zirrhose (PBC) und ihre Bedeutung im Hinblick auf Krankheitsaktivität und Prognose. Verh. Dtsch. Ges. Inn. Med. 88 (1982) 1057-1061

Wright, D.J.M., D. Doniach, M.H. Lessof, J.L. Turk, A.S. Grimble, R.D. Catterall: New antibody in early syphilis. Lancet I (1970) 740-744

Zimmermann, K., B. Cueni, M. Schmid: Kombinationsform chronisch aggressive Hepatitis / primär biliäre Zirrhose. Schweiz. Med. Wochenschr. 107 (1977) 1949-1952

Lebenslauf

Am 25.06.1952 wurde ich, Paul Weber, als Sohn des Paul Weber und seiner Ehefrau Rita, geb. Braun in Bad Waldsee geboren. Von 1959 bis 1963 besuchte ich die Volksschule in Bad Waldsee und anschließend das Progymnasium Bad Waldsee bis 1968. Die Oberstufe absolvierte ich am Neuen Gymnasium, jetzt Albert-Einstein-Gymnasium, in Ravensburg, wo ich im Juni 1971 die Reifeprüfung ablegte. Von 1971 bis 1973 leistete ich den Wehrdienst im Sanitätsdienst der Luftwaffe.

Im Wintersemester 1973 begann ich zunächst das Biologiestudium im Diplomstudiengang an der Universität Tübingen. Im Wintersemester 1974 legte ich die Vordiplomprüfung ab. Die Lehrveranstaltungen für das Hauptstudium mit den Fächern Allgemeine Mikrobiologie, Genetik, Biochemie und Pharmakologie absolvierte ich bis zum Sommersemester 1976. Im gleichen Semester wechselte ich an die Universität Giessen zur Aufnahme des Medizinstudiums. Im Sommersemester 1977 legte ich nach einem Hochschulwechsel nach Heidelberg die Ärztliche Vorprüfung ab. Nach Rückkehr an die Universität Tübingen im Wintersemester 1977 absolvierte ich den 1. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung im August 1978, den 2. Abschnitt im August 1980 und den 3. Abschnitt nach dem Praktischen Jahr am Universitätsklinikum Tübingen mit der mündlichen Prüfung am 19.10.1981.

Unter Leitung von Herrn Professor Berg an der Medizinischen Klinik Tübingen begann ich im November 1977 mit Untersuchungen über Mitochondrienantigene. Die vorliegende Arbeit umfaßt hauptsächlich Daten aus den Jahren 1978 bis 1981.

Vom 1.1.1982 bis 31.3.1983 war ich als Assistenzarzt an der Röntgenabteilung des Kreiskrankenhauses Reutlingen (Chefarzt: Dr. Gelinsky) beschäftigt. Seit 1.4.1983 arbeite ich als wissenschaftlicher Angestellter in der Abteilung I (Leiter: Prof. Dr. Dölle) der Medizinischen Klinik Tübingen.